

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SANTIAGO DEL ESTERO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y AGROINDUSTRIAS



“DESARROLLO Y APLICACIÓN DE (BIO)SENSORES  
AMPEROMÉTRICOS PARA ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES  
EN TEJIDOS VEGETALES”

DOCTORADO REGIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS:  
ORIENTACION CIENCIA

Lic. Fiorella Giovanna Tulli

Santiago del Estero, República Argentina

Marzo, 2019





**UNSE**  
Universidad Nacional  
de Santiago del Estero



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL  
GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTORA EN ALIMENTOS**

DOCTORADO EN RED EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
Resol. H.C.S UNSE N° 129/2012; Categoría A Resolución CONEAU 1189/12.

**Directora**

Dra. Silvia del C. Rodríguez

**Vice Directora**

Dra María Alejandra Bertuzzi



**UNSE**  
Universidad Nacional  
de Santiago del Estero



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE (BIO)SENSORES AMPEROMÉTRICOS  
PARA ÁCIDO ASCÓRBICO Y POLIFENOLES EN TEJIDOS VEGETALES**

**Tesista**

Lic. Fiorella Giovanna Tulli

**Directora**

Dra. Verónica I. Paz Zanini

**Co-Directora**

Dra. Beatriz A. López de Mishima

**Comisión de Seguimiento**

Dra. Verónica I. Paz Zanini  
Dra. Beatriz A. López de Mishima  
Dra. Silvia del C. Rodríguez  
Dr. Julio Raba

**Tribunal Examinador**

Dra. Patricia Ortiz  
Dra. Susana Ribotta  
Dra. Silvia del C. Rodríguez



Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Alimentos Orientación Ciencia, de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) y no fue presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC-CONICET), durante el periodo comprendido entre el 1 de abril de 2014 y 31 de marzo de 2019.

Bajo la dirección de la Dra. Verónica I. Paz Zanini, Profesora Asociada en la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA-UNSE) y codirección de la Dra. Beatriz A. López de Mishima, Profesora Emérita en la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA-UNSE), y miembros de la comisión de seguimiento, la Dra. Silvia del C. Rodríguez, Profesora Asociada en la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA-UNSE) y el Dr. Julio Raba, Profesor Asociado en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (FQBF-UNSL).

El tribunal examinador integrado por la Dra. Patricia Ortiz, Profesora Adjunta en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (FCQ-UNC), la Dra. Susana Ribotta, Profesora Titular en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (FBQyF-UNT) y la Dra. Silvia del C. Rodríguez, Profesora Asociada en la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA-UNSE), designadas mediante Resolución FAA N° 006/2019.



**UNSE**  
Universidad Nacional  
de Santiago del Estero

Con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE).



## *AGRADECIMIENTOS*

---

Quiero agradecer a todos aquellos seres que me proporcionaron los escenarios perfectos para poder realizar cada uno de mis aprendizajes:

A mi directora y co-directora, las Dras. Verónica I. Paz Zanini y Beatriz A. López de Mishima, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme la posibilidad de realizar el presente trabajo bajo su dirección y, por su aporte a mi formación científica.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento, los Dres. Verónica I. Paz Zanini, Beatriz A. López de Mishima, Silvia del C. Rodríguez y Julio Raba, por el tiempo y apoyo dedicados en el seguimiento de este trabajo de tesis.

A los miembros del Jurado, las Dras. Silvia del C. Rodríguez, Patricia Ortiz y Susana Ribotta, por su tiempo, predisposición y contribución.

Al Director del INBIONATEC, el Dr. Claudio D. Borsarelli, por su predisposición, su colaboración y su confianza.

A Sumi Coria, una gran amiga y compañera, una persona muy especial con un enorme corazón que he tenido la oportunidad de conocer y con la que he compartido durante estos años.

A Axel Hollmann, por su amistad, sus invaluable consejos de toda índole y por brindarse completamente.

A Laura Lemos, por su predisposición, su entrega, su compañerismo y su colaboración desde el primer momento en que comenzamos a trabajar.

A todos los seres que he conocido y compartido durante este tiempo, Patricia Maturana, Jimena Cejas, Juan Manuel Fernández, Eduardo Parrellada, Maximiliano



Gavilán, Nicolás Gallucci, Anike Ferreyra, Florencia Gulotta, Virginia Araujo, Fátima Varas, Anabel Ayunta, Claudia Quinzio, Anahi Soria, Andrea Cutró, Marcelo Sosa, Beatriz Luna y Damián Uñates. Sin dudas, el tiempo compartido ha hecho crecer una hermosa amistad con muchos de ellos. Su compañía ha hecho que todo sea más divertido y mejor.

A todo el personal de Posgrado de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias (FAyA) de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.

A la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado formación gratuita mediante el financiamiento de este trabajo a través de una beca doctoral.

A mi Bien Amada PP, por asistirme siempre desde el AMOR, resolviendo cada uno de mis asuntos en perfección.

A mi madre Virginia, y mis hermanos Nahuel y Saywa, por su AMOR incondicional, su contención, su apoyo, su compañerismo y por alentarme en cada momento. Por motivarme a continuar creciendo, y ser cada día mejor.

A mis abuelos, Solita y Cacho, por creer siempre en mí y por sus sabios consejos. Por ser ejemplo de AMOR y perseverancia.

A mis tíos y primos, Belén, Matías, Enerio y Roxana, por su apoyo incondicional, por su cariño, su contención y por alentarme siempre.

A Sebastián Rosa, mi compañero de camino, por su inconmensurable paciencia, su amor, su entrega, su tiempo, sus consejos, su contención y por compartir cada uno de mis éxitos y fracasos.

A todos, infinita gratitud.



*Dedicado a mi amada familia.*

*Y a cada uno de los seres con los que he tenido la oportunidad  
de reencontrarme a lo largo de todo mi proceso.*



*“La Verdad es más extraña que la ficción.  
La simplicidad del sentimiento y de la expresión  
es la que trae la gran liberación de los Poderes de la Libertad.  
Sólo en la complicación de la expresión  
es donde tan a menudo se esconde la Verdad.”*

**Godfré Ray King**



Los (bio)sensores electroquímicos son dispositivos capaces de medir componentes de interés en la industria alimentaria, proporcionando una serie de ventajas (alta estabilidad, bajo ruido, bajo límite de detección, reproducibilidad, menor volumen de muestra, corto tiempo de análisis, especificidad, versatilidad, etc.) frente a otras metodologías analíticas que hacen que este tipo de investigaciones resulten de interés prioritario. Por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas de las plataformas de sensado son un aspecto de suma relevancia tanto del punto de vista teórico como su potencial aplicación. En el presente trabajo se presenta el diseño y desarrollo de (bio)electrodos que fueron aplicados en la detección de polifenoles y ácido ascórbico en muestras de alimentos. La tesis se presenta en las siguientes secciones:

- ✚ **Parte I – Aspectos Teóricos (Capítulo 1):** Se presenta la revisión bibliográfica sobre los sensores electroquímicos, y su aplicación para la detección de analitos de interés alimentario. Además, se expone la relevancia de los alimentos mínimamente procesados y su capacidad antioxidante. Y por último, se describen algunas características fisicoquímicas de los diferentes materiales nanoestructurados utilizados en esta tesis.
- ✚ **Parte II - Resultados y Discusión (Capítulos 2-6):** El capítulo 2 trata sobre el desarrollo, diseño y caracterización fisicoquímica de un biosensor para polifenoles utilizando materiales nanoestructurados como arcillas, nanopartículas de oro, polímeros biocompatibles y la enzima peroxidasa de rábano picante. La caracterización se llevó a cabo mediante técnicas electroquímicas, espectrofotométricas UV-Visible y espectroscopía FTIR. El capítulo 3 expone la aplicación del biosensor desarrollado en la detección de polifenoles en extractos de vegetales (zanahorias y berenjenas) sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico (tipos de cortes y radiación UV-C). En el capítulo 4 se presenta la utilización de materiales nanoestructurados para el desarrollo y diseño de un sensor amperométrico para la detección de ácido ascórbico. Las matrices formadas por nanotubos de

carbono, nanopartículas de oro y polímeros biocompatibles fueron caracterizadas mediante técnicas electroquímicas y espectroscopía FTIR. El capítulo 5 trata sobre la aplicación del sensor nanoestructurado desarrollado en la detección de ácido ascórbico en extractos de berenjena sometidos a estrés abiótico (radiación UV-C). El capítulo 6 describe la combinación de estrategias para el diseño y desarrollo de un (bio)sensor utilizando pastas de grafito, materiales mesoporosos y la enzima glucosa oxidasa para la detección de otros analitos de interés, como la glucosa, en muestras de leche en polvo.

✚ **Parte III – Conclusiones:** El capítulo 7, muestra a modo de recapitulación de las conclusiones parciales, las conclusiones generales obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis, resaltando los logros más destacables de este trabajo.

✚ **Parte IV - Apéndices:** El apéndice 1 muestra las diferentes técnicas experimentales utilizadas en la presente tesis. En el apéndice 2 se enumeran los diferentes trabajos científicos presentados dentro del marco de este trabajo.

**Palabras claves:** (bio)sensores, ácido ascórbico, polifenoles, extractos vegetales, estrés abiótico.





The (bio)electrochemical sensors are devices capable of measuring components of interest in the food industry, providing a series of advantages (high stability, low noise, low detection limit, reproducibility, lower sample volume, short analysis time, specificity, versatility, etc.) compared to other analytical methodologies that make this type of research a priority interest. Therefore, the physicochemical properties of the sensing platforms are an aspect of great relevance both from the theoretical point of view and its potential application. In the present work, we present the design and development of (bio) electrodes that were applied in the detection of polyphenols and ascorbic acid in food samples. The thesis is presented in the following sections:

✚ **Part I - Theoretical Aspects (Chapter 1):** The bibliographic review about the electrochemical sensors is presented, and its application for the alimentary interest analytes detection. In addition, the relevance of minimally processed foods and their antioxidant capacity is exposed. And finally, some physicochemical characteristics of the different nanostructured materials used in this thesis are described.

✚ **Part II - Results and Discussion (Chapters 2-6):** Chapter 2 deals with the development, design and physicochemical characterization of a biosensor for polyphenols using nanostructured materials such as clays, gold nanoparticles, biocompatible polymers and the enzyme horseradish peroxidase. The characterization was carried out by means of electrochemical, UV-Visible spectrophotometric and FTIR spectroscopy techniques. Chapter 3 exposes the application of the biosensor developed in the detection of polyphenols in vegetable extracts (carrots and aubergines) subjected to different types of abiotic stress (types of cuts and UV-C radiation). Chapter 4 presents the use of nanostructured materials for the development and design of an amperometric sensor for the detection of ascorbic acid. The matrices formed by carbon nanotubes, gold nanoparticles and biocompatible polymers were characterized by electrochemical techniques and FTIR spectroscopy. Chapter 5 deals the application of the nanostructured sensor developed

in the detection of ascorbic acid in extracts of eggplant subjected to abiotic stress (UV-C radiation). Chapter 6 describes the combination of strategies for the design and development of a (bio) sensor using graphite pastes, mesoporous materials and the enzyme glucose oxidase for the detection of other analytes of interest, such as glucose, in samples of milk powder.

✚ **Part III – Conclusion:** Chapter 7 exposes as a recapitulation of the partial conclusions, the general conclusions obtained throughout this thesis work, highlighting the most outstanding achievements of this work.

✚ **Part IV - Appendices:** Appendix 1 shows the different experimental techniques used in this thesis. Appendix 2 lists the different scientific papers presented within the framework of this work.

**Keywords:** (bio) sensors, ascorbic acid, polyphenols, plant extracts, abiotic stress.



# ÍNDICE GENERAL

---

<b>PARTE I: Aspectos Teóricos</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Introducción a los sensores</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Clasificación y definición .....	3
<b>1.2. Sensores electroquímicos</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. Tipo de interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito .....	6
1.2.1.1. Sensores biocatalíticos .....	6
1.2.1.2. Sensores de bioafinidad .....	7
1.2.2. Sistema de transducción .....	7
<b>1.3. Enzimas</b> .....	<b>9</b>
1.3.1. Características generales .....	9
1.3.2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas .....	10
1.3.3. Sitio activo enzimático .....	11
1.3.3.1. Características generales .....	11
1.3.3.2. Hipótesis del ajuste inducido .....	11
1.3.4. Peroxidasas .....	12
1.3.4.1. Clasificación .....	12
1.3.5. Peroxidasa de rábano picante .....	13
1.3.5.1. Función y clasificación .....	13
1.3.5.2. Estructura .....	14
1.3.5.3. Mecanismo catalítico .....	15
<b>1.4. Biosensor amperométrico enzimático</b> .....	<b>16</b>
1.4.1. Métodos de inmovilización enzimática .....	17
1.4.2. Propiedades de las enzimas inmovilizadas .....	18
1.4.3. Modificación en los parámetros cinéticos .....	20
1.4.4. Clasificación de biosensores amperométricos enzimáticos .....	21

1.4.4.1. Biosensores de primera generación.....	21
1.4.4.2. Biosensores de segunda generación.....	22
1.4.4.3. Biosensores de tercera generación.....	23
<b>1.5. Alimentos mínimamente procesados.....</b>	<b>25</b>
1.5.1. Definición y clasificación.....	25
1.5.2. Estrés en alimentos mínimamente procesados.....	27
1.5.2.1. Estrés oxidativo y antioxidantes.....	28
<b>1.6. Algunas propiedades de interés de los nanomateriales.....</b>	<b>29</b>
1.6.1. Arcillas.....	29
1.6.1.1. Arcillas industriales.....	30
1.6.1.1.1. Laponita.....	32
<b>1.7. Polímeros adn-bioinspirados.....</b>	<b>36</b>
<b>1.8. Nanopartículas de oro.....</b>	<b>41</b>
1.8.1. Plasmones superficiales de nanopartículas metálicas.....	42
1.8.2. Nanopartículas de oro recubiertas de polímeros.....	44
1.8.2.1. Nanopartículas de oro recubiertas de cloruro de dialildimetilamonio.....	45
<b>1.9. Nanotubos de carbono.....</b>	<b>46</b>
1.9.1. Modificación superficial de los nanotubos de carbono.....	48
<b>1.10. Materiales mesoporosos.....</b>	<b>50</b>
<b>1.11. Objetivos.....</b>	<b>52</b>
1.11.1. Objetivo general.....	52
1.11.2. Objetivos específicos.....	53
<b>PARTE II: Resultados y Discusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1. Introducción.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>58</b>
2.2.1. Materiales.....	58

2.2.2. Medidas electroquímicas .....	59
2.2.3. Mediciones espectroscópicas .....	60
2.2.4. Preparación de los biosensores .....	61
2.2.5. Detección de polifenoles en muestras reales .....	61
<b>2.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>63</b>
2.3.1. Optimización de la composición del hidrogel .....	63
2.3.2. Parámetros analíticos para la detección de hidroquinona y ácido clorogénico .....	74
2.3.3. Determinación de la concentración de polifenoles en la yerba mate y el café verde .....	77
<b>2.4. Conclusiones .....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1. Introducción.....</b>	<b>81</b>
3.1.1. Alimentos mínimamente procesados. Efecto de diferentes tipos de cortes .....	82
3.1.2. Zanahorias sometidas a diferentes tipos de cortes .....	83
3.1.3. Alimentos mínimamente procesados. Efecto de diferentes intensidades de radiación UV-C ....	84
3.1.4. Berenjenas sometidas a diferentes intensidades de radiación UV-C .....	85
<b>3.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>86</b>
3.2.1. Preparación de muestras .....	86
<b>3.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>88</b>
3.3.1. Detección de polifenoles en extractos vegetales sometidos a estrés .....	88
<b>3.4. Conclusiones .....</b>	<b>93</b>
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>96</b>
<b>4.1. Introducción.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>97</b>
4.2.1. Materiales .....	97
4.2.2. Medidas electroquímicas .....	98
4.2.3. Preparación de nanopartículas de oro recubiertas con polielectrolitos .....	99

4.2.4. Preparación de los nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados .....	99
4.2.5. Preparación del sensor .....	100
<b>4.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>101</b>
4.3.1. Efecto de la composición de la película de hidrogel en el análisis de ácido ascórbico.....	101
4.3.2. Efecto del pH utilizando GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA/P <sup>16-</sup> .....	109
4.3.3. Parámetros analíticos del sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P <sup>16-</sup> .....	110
<b>4.4. Conclusiones .....</b>	<b>113</b>
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>116</b>
<b>5.1. Introducción.....</b>	<b>116</b>
<b>5.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>118</b>
5.2.1. Materiales .....	118
5.2.2. Medidas espectroscópicas.....	119
5.2.3. Preparación de las muestras.....	119
<b>5.3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>120</b>
5.3.1. Detección de ácido ascórbico en extractos vegetales sometidos a estrés.....	120
<b>5.4. Conclusiones .....</b>	<b>124</b>
<b>Capítulo 6 .....</b>	<b>127</b>
<b>6.1. Introducción.....</b>	<b>127</b>
<b>6.2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>129</b>
6.2.1. Materiales .....	129
6.2.2. Medidas electroquímicas .....	129
6.2.3. Mediciones espectroscópicas .....	130
6.2.4. Preparación de los electrodos modificados.....	131
6.2.5. Determinación de glucosa en muestras reales .....	132
<b>6.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>132</b>
6.3.1. Caracterización del CPE modificado con M y MFe .....	132



6.3.2. Caracterización del CPE modificado con M y MFe y GOx .....	136
6.3.3. Rendimiento analítico y aplicaciones prácticas de CPE modificado con M, MFe y GOx.....	139
6.3.4. Determinación de la concentración de glucosa en muestras de leche .....	143
<b>6.4. Conclusiones .....</b>	<b>144</b>
<b>PARTE III: Conclusiones .....</b>	<b>147</b>
<b>Capítulo 7 .....</b>	<b>149</b>
<b>PARTE IV: Apéndices .....</b>	<b>153</b>
<b>Apéndice 1 .....</b>	<b>155</b>
<b>1.1. Técnicas electroquímicas .....</b>	<b>155</b>
1.1.1. Voltamperometría cíclica.....	156
1.1.2. Cronoamperometría .....	162
1.1.3. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS).....	166
<b>1.2. Técnicas espectroscópicas .....</b>	<b>171</b>
1.2.1. Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-Vis) .....	171
1.2.2. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).....	173
<b>Apéndice 2 .....</b>	<b>176</b>
<b>2.1. Trabajos publicados .....</b>	<b>176</b>
<b>2.2. Trabajos en preparación o enviados .....</b>	<b>177</b>
<b>2.3. Trabajos presentados en reuniones científicas.....</b>	<b>177</b>
2.3.1. Congresos .....	177
2.3.2. Talleres y Seminarios .....	178
<b>Referencias .....</b>	<b>180</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.1.</b> Tipos de enzimas y reacción enzimática que catalizan. ....	10
<b>Tabla 1.2.</b> Diferentes tipos de esmectitas utilizadas en la modificación de electrodos. ....	31
<b>Tabla 2.1.</b> Parámetros ajustados para el circuito equivalente en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 10 mM (KCl 0,1 M) para a) GCE limpio y los GCE modificados desde b) a e). ....	64
<b>Tabla 2.2.</b> Propiedades electroanalíticas del biosensor seleccionado con $\text{H}_2\text{O}_2$ 600 $\mu\text{M}$ en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para adiciones sucesivas de HQ. Potencial de trabajo: -200 mV. ....	76
<b>Tabla 3.1.</b> Contenido de polifenoles expresados en mg CGA 1000 $\text{g}^{-1}$ tejido en extractos vegetales sometidos a estrés comparando los métodos electroquímico y espectrofotométrico. ....	93
<b>Tabla 4.1.</b> Parámetros analíticos para algunos electrodos no enzimáticos para la detección de ácido ascórbico. ....	112
<b>Tabla 5.1.</b> Contenido de $\text{AH}_2$ expresados en mg 100 $\text{g}^{-1}$ tejido en extractos vegetales sometidos a estrés comparando los métodos electroquímico y espectrofotométrico. ....	124
<b>Tabla 6.1.</b> Parámetros analíticos para $\text{H}_2\text{O}_2$ 1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe a -100 mV. ....	135
<b>Tabla 6.2.</b> Parámetros analíticos para $\text{H}_2\text{O}_2$ 1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe y con GOx a -100 mV. ....	138
<b>Tabla 6.3.</b> Parámetros analíticos para glucosa 1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe y con GOx a -100 mV. ....	141
<b>Tabla 6.4.</b> Parámetros analíticos de CPE/MFe/GOx para la detección de glucosa comparados con otros biosensores enzimáticos. ....	142



## PARTE I

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de un sensor.....	4
<b>Figura 1.2.</b> Esquema de funcionamiento de un biosensor.....	6
<b>Figura 1.3.</b> Esquema para representar la saturación de la enzima a medida que aumenta la concentración de sustrato.....	9
<b>Figura 1.4.</b> Hipótesis del ajuste inducido. a) El sitio activo está en el interior del denominado “bolsillo” de la proteína. b) El sustrato se ha introducido en el interior del sitio activo. El acomplejamiento con el sustrato produce un cambio en la configuración de la enzima (imagen tomada de <a href="http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/index.cgi?wid_item=1491&amp;wid_seccion=19">http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/index.cgi?wid_item=1491&amp;wid_seccion=19</a> ).....	12
<b>Figura 1.5.</b> Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante determinada por cristalografía de rayos X. Se muestra en azul el grupo hemo en posición central entre los dominios distal y proximal. Se representa una molécula de peróxido de hidrógeno (“PEO” marcada en magenta) situada sobre el plano del grupo hemo. Los iones calcio aparecen como esferas verdes y los puentes disulfuro se indican en amarillo (Watanabe et al., 2010).....	15
<b>Figura 1.6.</b> Métodos de inmovilización enzimática.....	17
<b>Figura 1.7.</b> Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de primera generación.....	21
<b>Figura 1.8.</b> Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de segunda generación.....	23
<b>Figura 1.9.</b> Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de tercera generación.....	24
<b>Figura 1.10.</b> Posibles sitios de adsorción en un gel de arcilla.....	31
<b>Figura 1.11.</b> Forma y dimensiones características de un cristal de laponita, indicando las cargas superficiales.....	33
<b>Figura 1.12.</b> Estructura de la celda unitaria de la laponita.....	33

<b>Figura 1.13.</b> Sitios de incorporación de agua en el proceso de delaminación de las arcillas. ....	34
<b>Figura 1.14.</b> Estructura tipo “castillo de naipes” de los geles de laponita.....	35
<b>Figura 1.15.</b> Estructuras químicas de los polímeros VBT-VPS y VBT-VBA.....	41
<b>Figura 1.16.</b> AuNP de diferentes tamaños.....	42
<b>Figura 1.17.</b> Suspensiones coloreadas, tamaño y espectros de absorción UV-visible para AuNPs de diferentes tamaños en citrato de sodio. ....	44
<b>Figura 1.18.</b> Tipos de CNT: (A) SWCNT (B) MWCNT. ....	46
<b>Figura 1.19.</b> Distintas “quiralidades” de los CNT.....	47
<b>Figura 1.20.</b> Síntesis y estructura de MCM-41. ....	51

## Capítulo 2

<b>Figura 2.1.</b> Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu utilizando volúmenes entre 0 y 100 $\mu\text{L}$ de una solución estándar de de ácido clorogénico $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . ....	62
<b>Figura 2.2.</b> Diagrama de Nyquist en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $10 \text{ mM}$ ( $\text{KCl}$ $0,1 \text{ M}$ ) para a) GCE limpio y los GCE modificados desde b) a e). Inserto: Circuito equivalente. ....	64
<b>Figura 2.3.</b> (A) Cronoamperogramas y (B) curvas de calibración para HQ con $600 \mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ en buffer fosfato $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH}$ 7 para los GCEs modificados con $30 \mu\text{g}$ de laponita+ $15 \mu\text{g}$ de $\text{P}^{4+}$ + $15 \mu\text{g}$ de HRP y diferentes cantidades de AuNPs: a) ninguna, b) $4,50$ , c) $9,00$ , y d) $13,5 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Potencial de trabajo: $-100 \text{ mV}$ .....	66
<b>Figura 2.4.</b> Cronoamperogramas para los GCEs modificados con $30 \mu\text{g}$ de laponita+ $15 \mu\text{g}$ de $\text{P}^{4+}$ + $4,50 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ + $15 \mu\text{g}$ de HRP en buffer fosfato $0,1 \text{ M}$ a $\text{pH}$ 7 para adiciones sucesivas (como se indica con las flechas) de: a) $\text{H}_2\text{O}_2$ $600 \mu\text{M}$ , b) hidroquinona $6 \mu\text{M}$ y c) ácido clorogénico $0,85 \mu\text{M}$ . Potencial de trabajo: $-100 \text{ mV}$ . ....	67
<b>Figura 2.5.</b> Esquema del mecanismo de las reacciones enzimáticas y del electrodo involucrados en la respuesta del biosensor electroquímico de HRP para compuestos fenólicos. Adaptado de (Yang et al., 2006). ....	68
<b>Figura 2.6.</b> Sensibilidad hacia HQ de los GCEs modificados con $600 \mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ en buffer fosfato $0,1 \text{ M}$ de acuerdo a: (A) contenido de Au ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en hidrogeles conteniendo $30 \mu\text{g}$ de laponita, $15 \mu\text{g}$ de HRP	

y 15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{\text{n+}}$  con n = a) 4, b) 8 y c) 16; (B) pH de la solución buffer; (C) potencial aplicado y (D) cantidad de HRP incorporada..... 70

**Figura 2.7.** Espectros UV-Vis de los componentes del hidrogel: 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{\text{4+}}$ +4,50 Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a) sin HRP y b) con la adición de 15  $\mu\text{g}$  de HRP. Inserto: Espectro de absorbancia normalizado de la HRP en buffer (línea sólida) y en el hidrogel (línea punteada) luego de la sustracción de la absorbancia de fondo del hidrogel..... 71

**Figura 2.8.** Curva de calibración para la HRP a diferentes concentraciones: 0,063; 0,125; 0,250; 0,500 y 1,000  $\text{mg mL}^{-1}$ , utilizando el biosensor seleccionado. .... 72

**Figura 2.9.** A) Espectros ATR-FTIR de la HRP en buffer a) y en el hidrogel obtenido luego de la sustracción de la absorbancia de fondo del hidrogel b). B) Espectro ATR-FTIR de a) la banda de vibración del estiramiento Si-O de la laponita luego de la incorporación sucesiva de: b) 15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{\text{4+}}$ , c) 4,50 Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y d) 15  $\mu\text{g}$  de HRP. .... 73

**Figura 2.10.** Voltamperogramas cíclicos de (A) CGA 100  $\mu\text{M}$ , y (B) HQ 100  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 registrados en ausencia  $\text{H}_2\text{O}_2$  con: a) GCE limpio y b) biosensor seleccionado Velocidad de barrido: 30  $\text{mV s}^{-1}$ . .... 74

**Figura 2.11.** Cronoamperograma y correspondiente curva de calibración para el biosensor optimizado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para adiciones sucesivas (A) HQ y (B) CGA. Potencial de trabajo: -200 mV. .... 75

**Figura 2.12.** Cronoamperogramas para el biosensor optimizado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para una alícuota de CGA 0,85  $\mu\text{M}$  y alícuotas sucesivas de 1,5, 2,1, 3,0 y 6,0  $\mu\text{M}$  de los diferentes interferentes: ácidos (A) ascórbico, (B) cítrico, (C) tartárico y (D) glucosa. .... 78

### Capítulo 3

**Figura 3.1.** Vegetales utilizados para determinar el contenido de polifenoles. .... 87

**Figura 3.2.** Cronoamperograma y curva de calibración para biosensor seleccionado (GCE modificado con 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{\text{4+}}$ +4,50 Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ +15  $\mu\text{g}$  de HRP) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para adiciones sucesivas CGA 0,85  $\mu\text{M}$ . Potencial de trabajo: -200 mV..... 88

**Figura 3.3.** Cronoamperogramas para biosensor seleccionado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 en extractos de (A) zanahorias y (B) berenjenas. Potencial de trabajo: -200 mV. Contenido de polifenoles a lo largo del período de almacenamiento para muestras de (C) zanahorias y (D) berenjenas.90

**Figura 3.4.** Contenido de PPh a lo largo del período de almacenamiento obtenido mediante el método espectrofotométrico en (A) zanahorias y (B) berenjenas. Comparación de ambos métodos en (C) zanahorias y (D) berenjenas. .... 92

#### Capítulo 4

**Figura 4.1.** Espectros ATR-FTIR de los nanotubos de pared múltiple (A) antes (MWCNT) y (B) después del tratamiento ácido de oxidación (fMWCNT). (C) Espectro de las AuNPs recubiertas con PPDA (AuNP@PPDA). .... 100

**Figura 4.2.** Voltamperogramas cíclicos registrados en  $\text{AH}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 a una velocidad de barrido de  $30 \text{ mV s}^{-1}$  obtenidos sobre los GCEs modificados con: a) MWCNT/AuNP@PPDA, b) MWCNT/AuNP@pVBA, c) fMWCNT/AuNP@pVBA, d) fMWCNT/AuNP@PPDA y, e) limpio. .... 101

**Figura 4.3.** Cronoamperogramas obtenidos a 50 mV para adiciones sucesivas de  $\text{AH}_2$  1  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 con el GCE modificado con: a) MWCNT/AuNP@PPDA; b) MWCNT/AuNP@pVBA; c) fMWCNT/AuNP@pVBA; y d) fMWCNT/AuNP@PPDA. Inserto: Curvas de calibración. .... 102

**Figura 4.4.** Espectro UV-Visible de las AuNPs recubiertas con PPDA o pVBA, obtenidos con una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. .... 104

**Figura 4.5.** (A) Voltamperogramas cíclicos obtenidos con GCE modificados con fMWCNT+AuNP@PPDA a una velocidad de barrido de  $30 \text{ mVs}^{-1}$  antes a) y después b) de la adición de  $\text{AH}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7. c) Voltamperogramas cíclicos en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 obtenidos luego de limpiar el electrodo utilizado en b). (B) El mismo procedimiento mencionado anteriormente pero utilizando el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PPDA/ $\text{P}^{16-}$ . .... 105

**Figura 4.6.** Diagramas de Nyquist en  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM para GCE a) limpio y modificados con b) fMWCNT+AuNP@PPDA y c) fMWCNT+AuNP@PPDA/ $\text{P}^{16-}$ . Inserto: Correspondiente circuito equivalente. .... 106

**Figura 4.7.** Voltamperogramas cíclicos en función de la velocidad de barrido (a: 10, b: 30, c: 50, d: 70, e: 100, f: 200, and g:  $300 \text{ mV s}^{-1}$ ) de una solución de  $\text{AH}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 obtenidos con los electrodos (A) GCE/fMWCNT/AuNP@PPDA, y (B) GCE/fMWCNT/AuNP@PPDA/ $\text{P}^{16-}$ . (C) Variación de  $E_{pa}$  vs  $\log v$  para ambos electrodos modificados, junto con el ajuste con la Ecuación 4.3 para los datos del sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PPDA/ $\text{P}^{16-}$ . .... 108



**Figura 4.8.** (A) Voltagramas cíclicos en una solución de buffer fosfato 0,1 M a diferentes pH. (B) y (C) variación con el pH de la  $i_{pa}$  y  $E_{pa}$ , respectivamente. .... 109

**Figura 4.9.** (A) Cronoamperograma con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> a 50 mV tras la adición secuencial de AH<sub>2</sub> 1 μM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7; y (B) curva de calibración. Las gráficas (C) y (D) muestran la variación de la sensibilidad del electrodo en función del número de veces utilizado (solo se representaron gráficamente los valores cada diez veces de uso consecutivo) y durante varios días de uso, respectivamente. .... 111

**Figura 4.10.** Cronoamperogramas obtenidos con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> a 50 mV en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 luego de la adición de alícuotas de AH<sub>2</sub> 1 μM de (triángulos negros) en la adición secuencial de interferentes 0.5; 1 y 10 μM, respectivamente (triángulos magenta). .... 113

## Capítulo 5

**Figura 5.1.** Vegetales utilizados para determinar el contenido de ácido ascórbico. .... 120

**Figura 5.2.** Cronoamperograma y correspondiente curva de calibración para el GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para adiciones sucesivas de AH<sub>2</sub> 1 μM. Potencial de trabajo: 50 mV. .... 121

**Figura 5.3.** (A) Cronoamperogramas para el sensor seleccionado en 0,1 M de PBS pH 7 en extractos de berenjenas. Potencial de trabajo: 50 mV. (B) Contenido de AH<sub>2</sub> a lo largo del período de almacenamiento para los extractos utilizados. .... 122

**Figura 5.4.** (A) Contenido de AH<sub>2</sub> a lo largo del período de almacenamiento obtenido mediante el método espectrofotométrico en berenjenas. (B) Comparación de ambos métodos en los extractos utilizados. .... 123

## Capítulo 6

**Figura 6.1.** Espectros ATR-FTIR para el material de sílice mesoporosa sin dopar (M) y dopado con hierro (MFe). .... 131

**Figura 6.2.** Perfiles de corriente en función del potencial para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 sobre a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Inserto: Magnificación del gráfico . .... 133

**Figura 6.3.** Cronoamperogramas y curvas de calibración para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Potencial de trabajo: -100 mV. .... 134

<b>Figura 6.4.</b> Diagramas de Nyquist obtenidos en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 10 mM (KCl 0, 1 M) para a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Inseto: Circuito equivalente correspondiente. ....	136
<b>Figura 6.5.</b> Perfiles de corriente en función del potencial para $\text{H}_2\text{O}_2$ 10 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 sobre a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Inseto: Magnificación del gráfico. ....	137
<b>Figura 6.6.</b> Cronoamperogramas y correspondientes curvas de calibración para $\text{H}_2\text{O}_2$ 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Potencial de trabajo: -100 mV. ....	138
<b>Figura 6.7.</b> Diagramas de Nyquist obtenidos en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 10 mM (KCl 0, 1 M) para a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Inseto: Circuito equivalente. ....	139
<b>Figura 6.8.</b> Cronoamperogramas y curvas de calibración para glucosa 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Potencial de trabajo: -100 mV. ....	140
<b>Figura 6.9.</b> Cronoamperograma para CPE/MFe/GOx en buffer fosfato 0,1 M de a pH 7 para (A) una alícuota de 20 $\mu\text{L}$ de muestra en presencia de glucosa 2 mM y el posterior agregado de una alícuota de glucosa 1mM (B) una alícuota de glucosa 1 mM y alícuotas sucesivas de ácido ascórbico 0,02 mM, de ácido úrico 0,05 mM y de paracetamol 0, 09 mM. ....	144

## PARTE IV

### Apéndice 1

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de una celda de tres electrodos. ....	156
<b>Figura 1.2.</b> Señal de perturbación potencial-tiempo en experimentos de voltamperometría cíclica. ....	157
<b>Figura 1.3.</b> Voltamperograma cíclico típico para un proceso redox reversible monoelectrónico. ....	158
<b>Figura 1.4.</b> Perfiles de concentración de las especies reducida (en rojo) y oxidada (en azul) para una cupla redox a diferentes tiempos de electrólisis durante un experimento de voltamperometría cíclica donde (A) corresponde al potencial inicial, (B) y (D) al potencial formal de la cupla durante el barrido directo e inverso, respectivamente, y (C) al potencial necesario para agotar la concentración del reactante en la superficie del electrodo. ....	159
<b>Figura 1.5.</b> Voltamperogramas cíclicos para una reacción (A) irreversible y (B) cuasi-reversible. ....	161
<b>Figura 1.6.</b> Programa de potencial en función del tiempo en un experimento de cronoamperometría. ...	163

<b>Figura 1.7.</b> (A) Variación de la corriente con el tiempo en respuesta al potencial aplicado. (B) Perfiles de concentración resultantes, bajo condiciones de control difusional para un sistema electroquímico en el que $O + ne \rightleftharpoons R$ .....	165
<b>Figura 1.8.</b> Circuito equivalente de Randles. ....	169
<b>Figura 1.9.</b> Diagrama de Nyquist para un sistema electroquímico que involucra un proceso faradaico simple. Cada punto en el diagrama representa la impedancia a una frecuencia dada.....	170
<b>Figura 1.10.</b> Diagrama de Bode para el mismo sistema representado en la Figura 1.9. ....	171
<b>Figura 1.11.</b> Esquema del diseño instrumental de un espectrofotómetro y fotografías de los espectrofotómetros utilizados.....	172
<b>Figura 1.12.</b> Fotografías del equipo de ATR-FTIR.....	174



## *SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS*

---

$\varepsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\sigma$	Desviación estándar relativa
Abs	Absorbancia
AH <sub>2</sub>	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
AgCl	Cloruro de plata
Au	Oro
Au@PDDA	Nanopartículas de oro recubiertas con PDDA
Au@pVBA	Nanopartículas de oro recubiertas con pVBA
AuNP	Nanopartículas de oro
<i>C</i>	Concentración
CA	Cronoamperometría
CGA	Ácido clorogénico
Cl <sup>-</sup>	Anión cloruro
CNT	Nanotubos de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
<i>D</i>	Coefficiente de difusión
<i>E</i>	Potencial de Nersnt
<i>e</i> <sup>-</sup>	Electrones
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica

$E^{\circ}$	Potencial estándar de Nersnt
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
$EROs$	Especies reactivas de oxígeno
$F$	Constante de Faraday
fMWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados
FTIR	Infrarrojo por atenuada de Fourier
GCE	Electrodo de carbono vítreo
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
HQ	Hidroquinona
HRP	Peroxidasa de rábano picante
$i$	Corriente
$i_{pa}$	Corriente de pico anódico
$i_{pc}$	Corriente de pico catódico
$K_3[Fe(CN)_6]$	Ferricianuro de potasio
$K_4[Fe(CN)_6]$	Ferrocianuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
LOx	Lactato oxidasa
M	Material mesoporoso
MFe	Material mesoporoso dopado con hierro
MPF	Mínimamente procesados en fresco
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
$n$	Número de electrones
$O_2$	Oxígeno
PDDA	Cloruro de poli(dialildimetilamonio)

pI	Punto isoeléctrico
ppb	Partes por billón
PPh	Polifenoles
PPh <sub>ox</sub>	Polifenoles oxidados
PPh <sub>red</sub>	Polifenoles reducidos
ppm	Partes por millón
pVBA	Cloruro de poli(vinilbenciltrietilamonio)
Q <sub>dl</sub>	Capacitancia de la doble capa
R	Constante universal de gases ideales
R <sub>ct</sub>	Resistencia la transferencia de carga
rpm	Revoluciones por minuto
R <sub>s</sub>	Resistencia del electrolito soporte
s	Sensibilidad
SWCNT	Nanotubos de carbono de pared simple
T	Temperatura
UV	Ultravioleta
v	Velocidad
VBT-VBA, P <sup>16+</sup>	Vinilbencil timina-vinilbenciltrietilamonio
VBT-VPS, P <sup>16-</sup>	Vinilbencil timina-vinilfenilsulfonato
VC	Voltametría cíclica
W	Impedancia de Warburg
x	Distancia de la doble capa
δ	Espesor de la doble capa
ΔE <sub>p</sub>	Diferencia de potencial de pico





# PARTE I

---

## ASPECTOS TEÓRICOS



# Capítulo 1

---

## Introducción general y objetivos

### 1.1. INTRODUCCIÓN A LOS SENSORES

#### 1.1.1. Clasificación y definición

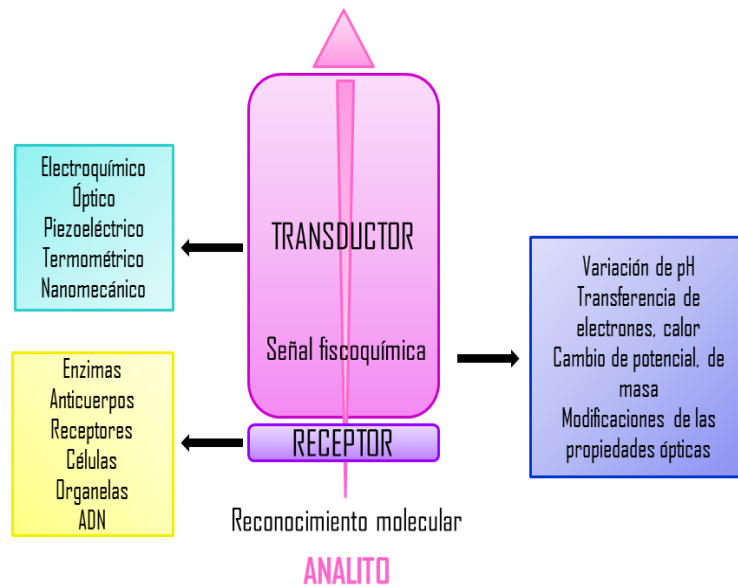
Los sensores consisten en un elemento de transducción cubierto por una capa de reconocimiento o receptor que interactúa con el analito de interés en la muestra. En una primera instancia, el receptor reconoce selectivamente la información presente en la muestra, y la convierte para poder ser reconocida por el transductor. Este último la transforma en una señal procesable fácilmente y amplificada (**Figura 1.1**), permitiendo la detección de un analito en una determinada matriz.

Según el *tipo de información que sean capaces de transformar*, los sensores se pueden clasificar en (Ristic and D'Aragona, 1994; Mello and Kubota, 2002):

- ✚ *Físicos*: dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.).
- ✚ *Químicos*: detectan cambios de pH, concentración, composición, etc, siendo estos los más utilizados actualmente.

Por otro lado, de acuerdo al tipo de transductor utilizado, los sensores pueden clasificarse en (Eggins, 1997; Mello and Kubota, 2002):

- ✚ *Ópticos*.
- ✚ *Piezoeléctricos*.
- ✚ *Térmicos*.
- ✚ *Nanomecánicos*.
- ✚ *Electroquímicos*.



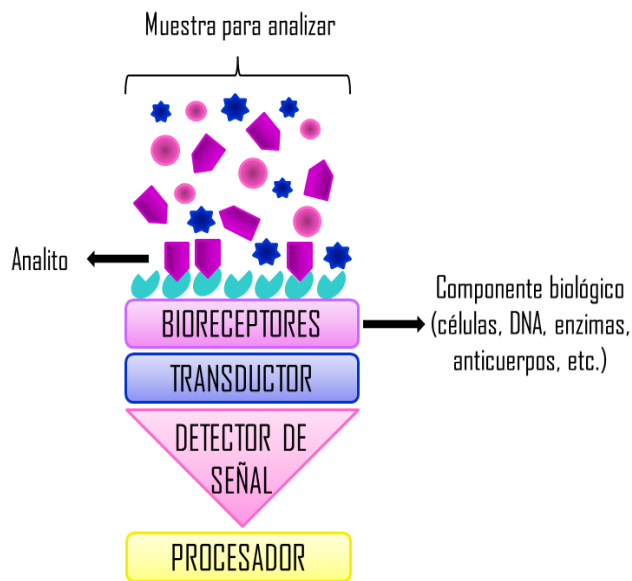
**Figura 1.1.** Esquema de un sensor.

## 1.2. SENSORES ELECTROQUÍMICOS

Durante las últimas décadas, el desarrollo de los sensores electroquímicos adquirió relevancia en la investigación científica debido a las excelentes características que poseen dichos dispositivos, convirtiéndolos en opciones altamente atractivas para competir en la industria con otras tecnologías (cromatografía, espectrofotometría, etc.). Estas características son:

- ✚ Especificidad, en general, pueden interaccionar exclusivamente con un compuesto de interés.
- ✚ Alta sensibilidad, algunos son capaces de valorar concentraciones de partes por billón.
- ✚ Corto tiempo de análisis, requieren pocos minutos (algunos, inclusive, sólo segundos) para cuantificar el compuesto de interés, y no precisan un período de espera largo hasta el siguiente análisis.
- ✚ Posibilidad de inclusión en sistemas integrados.
- ✚ Capacidad de trabajar en tiempo real, esta característica es especialmente interesante en el control de procesos, ya que permite controlar los parámetros de forma inmediata y automática.
- ✚ Versatilidad.

Dentro de los sensores electroquímicos, un tipo de dispositivos muy utilizados en los últimos tiempos son los **biosensores (Figura 1.2)**, los cuales contienen elementos de reconocimiento que *biológicos* (ácidos nucleicos, enzimas, anticuerpos, receptores, tejidos o células) o *biomiméticos* (polímeros de impresión molecular, aptámeros).



**Figura 1.2.** Esquema de funcionamiento de un biosensor.

## 1.2.1. Tipo de interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito

El principio de acción del biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado, se produce la variación de una o varias propiedades fisicoquímicas detectables por el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa del analito sometido a estudio y proporcional a su concentración en la muestra (Mello and Kubota, 2002).

### 1.2.1.1. Sensores biocatalíticos

Estos tipos de biosensores son los más conocidos y más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen cinéticamente una

reacción química sin consumir el correspondiente biocatalizador, ya que éste se regenera y puede ser utilizado nuevamente. A continuación, se enumeran los elementos de reconocimiento de tipo biocatalítico:

- ✚ *Enzimas.*
- ✚ *Células completas.*
- ✚ *Organelas subcelulares.*
- ✚ *Tejidos.*

### ***1.2.1.2. Sensores de bioafinidad***

Estos dispositivos se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica. Se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor. Para medir la interacción, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele marcar el receptor o bien utilizar un elemento que compita ya sea con el analito por la unión al receptor, o con una enzima que cataliza una reacción biocatalítica complementaria que es la que se detecta por el sistema de transducción. Existen distintos tipos de receptores de bioafinidad como:

- ✚ *Anticuerpos.*
- ✚ *Células completas.*
- ✚ *Ácidos nucleicos.*
- ✚ *Polímeros de impresión molecular, PIMs, sintetizados artificialmente.*
- ✚ *Aptámeros.*

### **1.2.2. Sistema de transducción**

La elección de un sensor electroquímico apropiado está gobernada por diferentes requerimientos: 1) la naturaleza del sustrato a ser determinado (iones o especies rédox),

2) la forma del sensor (microelectrodos), 3) la selectividad, la sensibilidad, y la velocidad para realizar las medidas y, 4) la confiabilidad y estabilidad de la plataforma. Dentro de los diferentes tipos de sensores con sistema de transducción electroquímica, los más utilizados son los que operan tanto en un modo potenciométrico como amperométrico. En particular, este último monitorea un flujo de corriente cuando se aplica un potencial (fijo o variable) sobre un electrodo de trabajo respecto a un electrodo de referencia. Además, un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica (Thévenot *et al.*, 2001).

Los dispositivos amperométricos están basados en la relación lineal existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica que produce al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo. Esta proporcionalidad intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Primera Ley de Fick:

$$i = nFAD_0 \frac{\delta(c_0(0,t))}{\delta x} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde  $A$  es el área del electrodo de trabajo,  $D_0$  y  $C_0$  son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y  $\delta x$  representa el espesor de la doble capa. En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que  $\delta x$  se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión ( $\delta$ ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito:

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0 \quad (\text{Ec. 1.2})$$

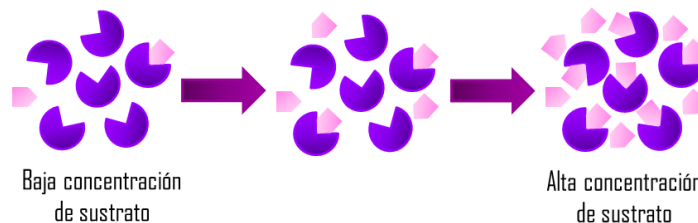
Como se detallará en capítulos posteriores, el diseño, desarrollo y caracterización fisicoquímica tanto de un sensor como un biosensor de tipo amperométricos, se han elegido en la presente tesis como temas de estudio.



## 1.3. ENZIMAS

### 1.3.1. Características generales

Todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Son catalizadores sumamente específicos capaces de aumentar la velocidad de una reacción en un factor de hasta  $10^{20}$  respecto de la reacción no catalizada (Scheller and Schubert, 1992). Esto se debe a que a medida que aumenta la concentración del sustrato, mayor número de centros catalíticos estarán ocupados, incrementando la eficiencia de la reacción hasta que todos los sitios posibles estén ocupados. En ese momento se habrá alcanzado el punto de saturación de la enzima y, aunque se añada más sustrato, no aumentará más la eficiencia. Tal situación se esquematiza en la **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** Esquema para representar la saturación de la enzima a medida que aumenta la concentración de sustrato.

Con excepción de algunos ARN (ribozimas) que tienen actividad catalítica, todas las enzimas son proteínas (Stryer, 1995). En algunas enzimas este esqueleto proteico es el único componente en su estructura. Sin embargo, es posible encontrar en la mayoría de los casos residuos adicionales no proteicos, los cuales pueden o no participar en la biocatálisis. Habitualmente se encuentran hidratos de carbono covalentemente unidos los que, en general, no se relacionan directamente con la actividad catalítica, pero pueden afectar la estabilidad y solubilidad de la enzima. Otros

factores que se encuentran a menudo son iones metálicos (cofactores) o bien moléculas orgánicas de bajo peso molecular (coenzimas) (Stryer, 1995; Voet, D. and Voet, J.G., 1995; Boyer, 2000; Chaplin and Bucke, 2000). Los cofactores y coenzimas son importantes constituyentes y contribuyen a la actividad y estabilidad de las enzimas, encontrándose libres o fuertemente asociados por uniones covalentes o de otro tipo.

### 1.3.2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas

Las enzimas poseen un nombre recomendado (añadiendo el sufijo -asa al nombre del sustrato) y un número distintivo compuesto por 4 dígitos, lo cual permite clasificarlas en seis grupos principales de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (Stryer, 1995; Voet, D. and Voet, J.G., 1995; Boyer, 2000; Chaplin and Bucke, 2000):

**Tabla 1.1.** Tipos de enzimas y reacción enzimática que catalizan.

<b>Clase Principal</b>	<b>Tipo de Reacción Catalizada</b>
<b>Oxidorreductasas</b>	Reacciones de oxidorreducción de todo tipo
<b>Transferasas</b>	Transferencia de un grupo de átomos intacto de una molécula donora a una aceptora
<b>Hidrolasas</b>	Ruptura hidrolítica de enlaces
<b>Liasas</b>	Ruptura de enlaces por medios distintos a la hidrólisis y la oxidación
<b>Isomerasas</b>	Interconversión de diversos isómeros
<b>Ligasas</b>	Formación de enlaces debido a la condensación de dos sustancias diferentes; la energía se toma del ATP

### **1.3.3. Sitio activo enzimático**

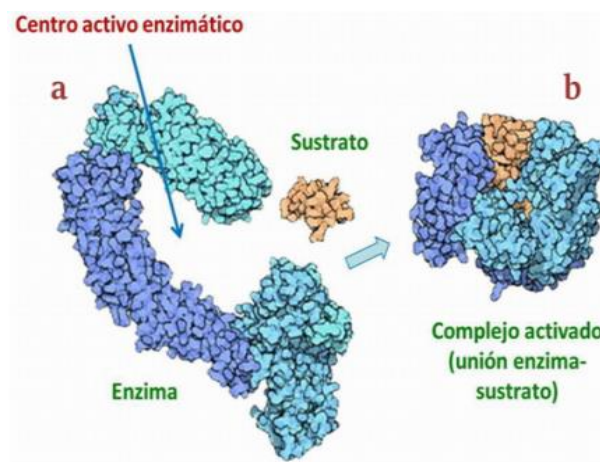
#### ***1.3.3.1. Características generales***

Las enzimas poseen otras características interesantes, además de su capacidad de catalizar una determinada reacción. Otro rasgo significativo es la capacidad de la enzima para fijar y orientar en el espacio las moléculas reactivas, unas respecto a otras y respecto a la propia enzima, de modo que se incrementa al máximo la frecuencia de reacción. La fijación y la reacción subsecuente ocurren en un sitio específico de la superficie de la enzima, denominado *sitio activo*. El sitio activo tiene la función de reconocer el sustrato y de fijarlo con exclusión de cualquier otra molécula (al menos si la enzima es muy específica). Es decir que su estructura es constante y está adaptada al sustrato a reconocer. El sitio de reconocimiento del sustrato generalmente sólo está constituido por algunos aminoácidos, como máximo una decena, pero éstos no están forzosamente situados unos junto a otros sobre una misma secuencia de la cadena polipeptídica. En efecto, el plegamiento de ésta para formar las estructuras secundaria y terciaria puede perfectamente aproximar los residuos de aminoácidos, a gran distancia en la estructura primaria o que pertenecen a cadenas polipeptídicas diferentes. El reconocimiento está asegurado por complementariedad entre superficie del sitio activo y superficie del sustrato. Esta fijación estrechamente complementaria es importante pero no es la única función correspondiente al sitio activo. Este último también contiene un centro catalítico, formado por un número restringido de residuos de aminoácidos, a veces uno solo, cuyas cadenas laterales participan directamente en intercambios de electrones o de radicales con el sustrato, lo que constituye la base misma del fenómeno catalítico.

#### ***1.3.3.2. Hipótesis del ajuste inducido***

Cuando Emil Fischer postuló, en 1984, la existencia de sitios activos, comparó la relación entre el sitio activo y el sustrato con la que existe entre una cerradura y su llave. Según este modelo las enzimas tendrían especificidad absoluta respecto de sus sustratos y no catalizarían reacciones de otras moléculas estructuralmente relacionadas.

Sin embargo, estudios posteriores demostraron la flexibilidad del sitio activo, dado que se comprobó que existen ciertas enzimas que catalizan reacciones de diferentes sustratos. La unión entre la enzima y el sustrato parece alterar la conformación de la enzima, induciendo de este modo cierto ajuste entre el sitio activo y el sustrato (**Figura 1.4**). Se cree que este ajuste inducido puede crear cierta tensión en las moléculas reactivas y facilitar de esta manera la reacción (Curtis and Barnes, 2000).



**Figura 1.4.** Hipótesis del ajuste inducido. a) El sitio activo está en el interior del denominado “bolsillo” de la proteína. b) El sustrato se ha introducido en el interior del sitio activo. El acomplejamiento con el sustrato produce un cambio en la configuración de la enzima (imagen tomada de [http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/index.cgi?wid\\_item=1491&wid\\_seccion=19](http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/index.cgi?wid_item=1491&wid_seccion=19)).

## 1.3.4. Peroxidasas

### 1.3.4.1. Clasificación

Las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del  $H_2O_2$ . Se encuentran ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal y se pueden clasificar en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas y otra superfamilia (no relacionada estructuralmente con la anterior) constituida por las peroxidasas animales (Susumu *et al.*, 2017). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y

bacterianas se han definido tres clases en función de las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- ✚ *Clase I*: compuesta por peroxidasas bacterianas, citocromo c peroxidasa y las ascorbato peroxidasas vegetales (Eisenstadt and Bogolitsyn, 2010). No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. En general, son consideradas como muy termolábiles.
- ✚ *Clase II*: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas incluidas las ligninaperoxidasas (LiP), las manganeso-peroxidasas (MnP) y las peroxidasas fúngicas de secreción (Eisenstadt and Bogolitsyn, 2010).
- ✚ *Clase III*: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción con características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, estando localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares. Muestran una baja especificidad de sustrato, con una moderada, pero notable, afinidad por el alcohol coniferílico, además de presentar una inusual estabilidad térmica (Passardi *et al.*, 2007).

## 1.3.5. Peroxidasa de rábano picante

### 1.3.5.1. *Función y clasificación*

La peroxidasa de rábano picante (HRP), pertenece a las peroxidasas de clase III, ya que es una glicoproteína con un peso molecular comprendido entre 40 y 45 kDa (Susumu *et al.*, 2017). La HPR cataliza la oxidación de una amplia gama de productos orgánicos e inorgánicos, tales como fenoles o aminas aromáticas, y los electrones son transmitidos al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se reduce a  $H_2O$ . La actividad catalítica depende principalmente de la estructura molecular de la enzima (**Figura 1.5**). Sin embargo, existe una gran dificultad para asignar una función específica a HRP debido a su baja especificidad de sustrato y a la presencia de muchas isoenzimas. Dicha proteína puede considerarse como una enzima bifuncional, ya que oxida varios sustratos

en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también produce especies reactivas de oxígeno (EROs) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Susumu *et al.*, 2017). Se han descrito isoenzimas de HRP con capacidad de soportar diferentes ambientes de pH. Se diferencian 3 grupos:

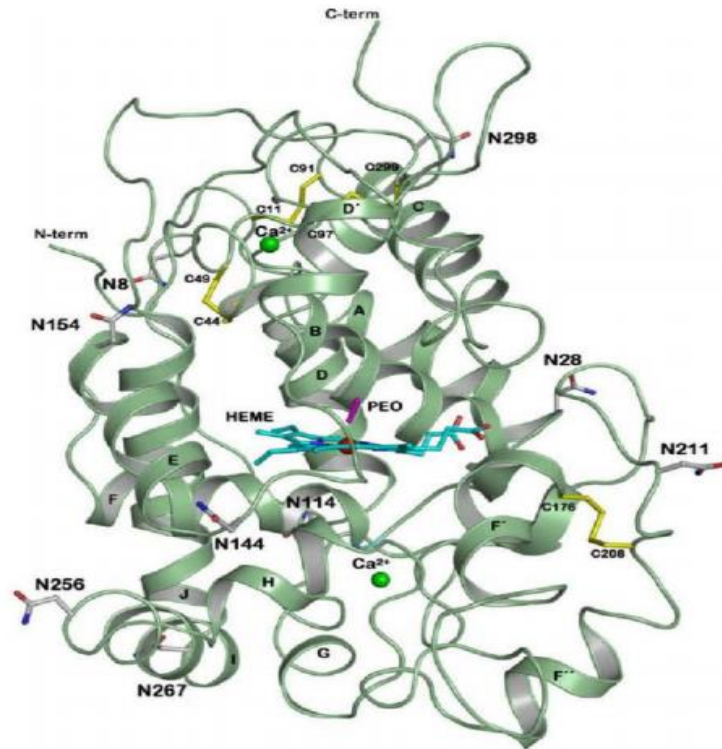
- ✚ *Isoenzimas aniónicas o ácidas*: soportan un pH menor que 7, se caracterizan por la presencia de un alto contenido en carbohidratos.
- ✚ *Isoenzimas neutras*: Comprenden un pH entre 7 y 9. También se conocen con el nombre de isoenzimas ligeramente básicas.
- ✚ *Isoenzimas catiónicas o básicas*: Soportan un pH mayor a 11, se caracterizan por un bajo contenido en carbohidratos.

### ***1.3.5.2. Estructura***

La HRP contiene como grupo prostético una molécula de protohemina IX así como dos iones estabilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . En su estado nativo el átomo de Fe está en estado de oxidación +3 (Fe III). Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína, que se ha conservado durante la evolución. El sexto lugar de coordinación permanece libre, lo que determina el estado de espín del hierro. El grupo prostético es esencial para la actividad enzimática puesto que es la clave estructural para estabilizar las peroxidasas (**Figura 1.5**).

Análisis cristalográficos y estudios de modelos informáticos revelaron que la proteína presenta una estructura globular compuesta por 308 aminoácidos formando una cadena sencilla, conteniendo entre 10-12 hélices- $\alpha$ , 2 láminas  $\beta$  cortas y 4 puentes disulfuro situados sobre la base de los residuos cisteína, encargados de mantener rígida la estructura (**Figura 1.5**). A pesar de que la estructura está muy conservada, pueden producirse variaciones debidas en gran parte a la glicosilación de la enzima, que varía entre el 0 y el 25%, siendo los principales glicanos, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina y galactosa. La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan las hélices, de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la

molécula. La glicosilación es uno de los principales factores responsables de la gran estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales.



**Figura 1.5.** Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante determinada por cristalografía de rayos X. Se muestra en azul el grupo hemo en posición central entre los dominios distal y proximal. Se representa una molécula de peróxido de hidrógeno (“PEO” marcada en magenta) situada sobre el plano del grupo hemo. Los iones calcio aparecen como esferas verdes y los puentes disulfuro se indican en amarillo (Watanabe *et al.*, 2010).

### ***1.3.5.3. Mecanismo catalítico***

La estructura tridimensional de la proteína junto con la estructura del metal ayuda a la función catalítica establecida por el grupo hemo, proporcionando un ambiente catalítico idóneo para reacciones de transferencia de electrones. Los residuos del dominio distal junto a los residuos del dominio proximal participan en la estabilización del grupo hemo. El lado distal no sólo interviene en la estabilización del

grupo hemo sino que se mantiene en contacto con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La reacción catalítica en presencia de  $H_2O_2$  da como resultado la formación de HRP oxidada. Esta última toma los electrones de una amplia gama de productos orgánicos e inorgánicos, generando los correspondientes intermedios enzimáticos como el compuesto I (estado de oxidación +5) que comprende una especie de ferril ( $Fe^{IV+}=O$ ) y el compuesto II (estado de oxidación +4) y, finalmente, se produce la conversión a su estado nativo en la forma reducida (Ruzgas *et al.*, 1996).

## **1.4. BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO**

En 1962 Clark y Lyons desarrollaron el primer biosensor analizador de glucosa, el cual fue comercializado a partir de 1975. Dicho dispositivo estaba formado por un recinto que contenía una enzima, glucosa oxidasa, acoplada a una celda amperométrica para oxígeno.

En este tipo de biosensor, el bioelemento es una enzima apropiada o un tejido que la contiene. Para que el proceso de transducción sea viable es requisito fundamental que sus sustratos o productos sean electroquímicamente activos. La señal fisicoquímica tiene su origen en la interacción entre el sustrato y la enzima, ya sea debida a la desaparición de sustrato, a la aparición de producto, a cambios en la concentración del regenerador de la enzima o cambios de algún componente empleado como indicador. Dicha señal fisicoquímica será colectada por el transductor amperométrico, que se encuentra en íntimo contacto con el receptor biológico, y permite que la reacción electroquímica (oxidación o reducción) que tiene lugar en la superficie del electrodo, dé lugar a una corriente. Esta corriente deberá estar directamente relacionada con la concentración del sustrato en el seno de la solución. Es importante que la transferencia electrónica entre las moléculas biológicas y el material del electrodo ocurran sin interferencias.



### 1.4.1. Métodos de inmovilización enzimática

En la construcción de un biosensor, la inmovilización del receptor o elemento de reconocimiento sobre una membrana o matriz, que a su vez se fija a la superficie del transductor, es una etapa fundamental, ya que características tan significativas como el tiempo de vida o la sensibilidad dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada.

La matriz en la cual se encuentra inmovilizado el elemento de reconocimiento, puede actuar únicamente como soporte o participar además en la transmisión de la señal al sistema de transducción (por ejemplo, mediante la inclusión de mediadores para las reacciones rédox).

Por otra parte, los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son la alteración de la conformación del material biológico respecto de su estado nativo y, en el caso de la utilización de enzimas, pérdidas de su actividad catalítica (Arroyo, 1998).

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes grupos, retención física y unión química como se muestra en la **Figura 1.6** (Arroyo, 1998).



**Figura 1.6.** Métodos de inmovilización enzimática.

En el caso particular de atrapamiento, se produce la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamina, PVC, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. También se suelen utilizar hidrogeles (Iveković *et al.*, 2004), como poly(2-hydroxyetil metacrilato) (p(HEMA)), o polímeros conductores, como polipirrol (Alonso Lomillo *et. al.*, 2005).

Es un método sencillo requiriéndose poca cantidad de material biológico y con la ventaja de que la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Aunque uno de los inconvenientes es la dificultad en la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor (Eggins, 1997).

### **1.4.2. Propiedades de las enzimas inmovilizadas**

Cuando se inmoviliza una enzima en una matriz o soporte sólido pueden producirse algunas variaciones en su comportamiento y propiedades, tales como cambios en la actividad, pH óptimo, selectividad y estabilidad.

Las modificaciones menos significativas se presentan en el caso de la inmovilización física ya que la enzima mantiene su identidad química. En cambio, cuando la inmovilización involucra enlaces covalentes pueden ocurrir alteraciones en la estructura secundaria y terciaria debido a múltiples interacciones con el sustrato de inmovilización.

El proceso de inmovilización puede perturbar o modificar las propiedades catalíticas de una enzima a través de distintos efectos:

- ✚ *Efectos conformacionales:* Pueden tener lugar en el dominio del sitio activo, tanto a nivel del sitio catalítico como del sitio de unión de la molécula proteica. Especialmente, las alteraciones ocurren a nivel de la estructura terciaria del dominio del sitio activo. La habilidad de una enzima para actuar como un catalizador específico depende

fundamentalmente de dos factores: i) debe encontrarse precisamente en la conformación correcta y ii) debe ser capaz de cambiar o adecuar su conformación durante la catálisis. Si la actividad catalítica de la molécula proteica depende tan estrechamente de la conformación, cabe esperar alteraciones en los parámetros cinéticos como consecuencia de la inmovilización en un soporte dado (Trevan, 1980). En mayor o menor medida, en su unión al soporte la enzima puede ser forzada a adoptar una conformación no favorable para la catálisis.

- ✚ *Efectos estéricos*: la molécula enzimática podría ser inmovilizada en una posición tal que el sitio activo sea inaccesible para el sustrato. O bien, una determinada fracción de las moléculas de enzima pueden unirse al soporte de manera que el sitio activo quede bloqueado por la matriz.
- ✚ *Efectos microambientales y efectos de partición*: están dados por interacciones (atracción o repulsión) entre el soporte y solutos (sustrato, producto, inhibidores, cofactores, etc.). En estos casos, las condiciones del microambiente próximo a la enzima son diferentes de aquellas en el seno de la solución. El reparto desigual de solutos es consecuencia de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas con la matriz y afecta tanto a los solutos, que no participan en la reacción; como a los reactantes, provocando su concentración o agotamiento en las proximidades de la enzima (Trevan, 1990).
- ✚ *Efectos difusionales*: se deben a la resistencia a la difusión de sustratos hacia el sitio activo de la enzima y del producto de reacción hacia el seno de la solución. La limitación de la libre difusión de moléculas de sustrato debida a la presencia física de la matriz determinará el agotamiento de moléculas de sustrato y la acumulación de moléculas de producto alrededor de la enzima.

### 1.4.3. Modificación en los parámetros cinéticos

Una vez inmovilizada la enzima, pueden ocurrir a su vez, interacciones entre los efectos antes mencionados, y la intensidad del efecto de alguno de ellos podrá depender de la magnitud de otro. No obstante, existen parámetros cinéticos diferenciados de acuerdo con el efecto que realmente controla el comportamiento cinético de la enzima inmovilizada.

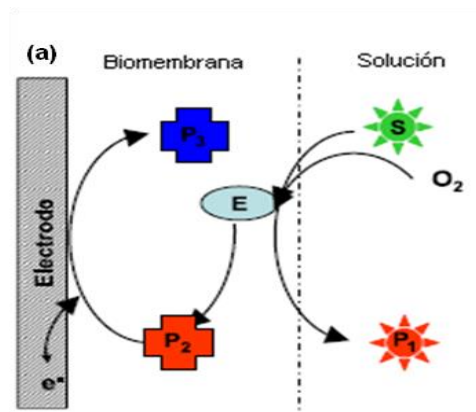
- ✚ *Parámetros cinéticos intrínsecos:* caracterizan el verdadero comportamiento cinético de la enzima inmovilizada ya que tienen que ver con alteraciones conformacionales y efectos estereoquímicos producidos por la fijación a un soporte. Estos aspectos están íntimamente relacionados con la estructura molecular de las proteínas por lo que incidirán de manera diferente en distintas enzimas. La investigación de las propiedades intrínsecas después de la inmovilización es una tarea dificultosa, si se tiene en cuenta que algunos métodos, por ejemplo, los espectrofotométricos, son interferidos por la mayoría de los materiales soportes utilizados en procesos de inmovilización. Además, los propios métodos cinéticos pueden ser interferidos por fenómenos de transporte y efectos microambientales. De todos modos, se han encontrado diferencias en la afinidad hacia sustratos e inhibidores como consecuencia de efectos directos de la inmovilización sobre la molécula enzimática, llevando a una alteración de las propiedades intrínsecas de la enzima (Buchholz and Klein, 1987).
- ✚ *Parámetros cinéticos inherentes:* son parámetros cinéticos observados en ausencia de limitaciones difusionales o efectos de partición, esto es, cuando el transporte de sustrato y producto entre la enzima en el micro y macro ambiente son infinitamente rápidos. Esto ocurre cuando existe relativamente baja actividad enzimática y eficiente agitación del medio.
- ✚ *Parámetros cinéticos efectivos o reales:* son los observados en presencia de efectos difusionales, de partición, conformacionales y estereoquímicos.

## 1.4.4. Clasificación de biosensores amperométricos enzimáticos

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor amperométrico, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores amperométricos.

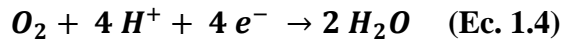
### 1.4.4.1. Biosensores de primera generación

Están basados en la cuantificación de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática (**Figura 1.7**).

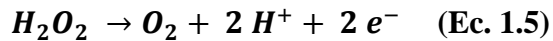


**Figura 1.7.** Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de primera generación.

El electrodo de Clark pertenece a este grupo. Este biosensor fue construido inmovilizando glucosa oxidasa (GOx) mediante una membrana de diálisis permeable al oxígeno. La concentración de glucosa presente en el medio es cuantificada mediante la reducción del oxígeno en un cátodo de platino a  $-700$  mV, de acuerdo con el siguiente mecanismo:



En 1973, Guilbault y Lubrano (Guilbault and Lubrano, 1973), desarrollaron un nuevo tipo de biosensor de primera generación basado en la oxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generada por la reacción enzimática:



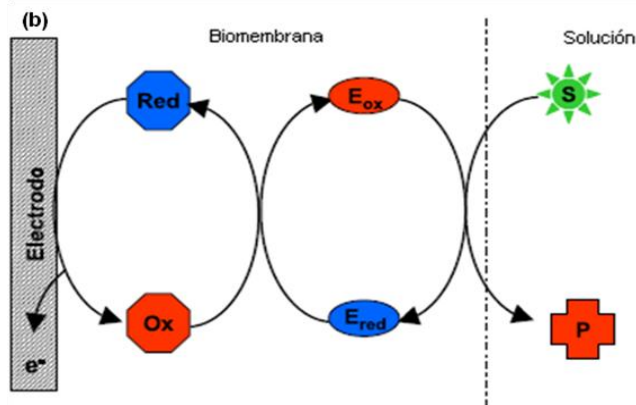
En el caso de biosensores basados en dehidrogenasas, es necesaria la presencia del cofactor nicotinamida adenin dinucleótido (NAD). El seguimiento de la reacción catalítica se realiza mediante la oxidación del NADH:



El inconveniente de estos cofactores es la necesidad de aplicar sobre potenciales muy altos, que pueden oxidar o reducir a su vez otros analitos que haya en el medio (interferentes). Además, en este tipo de reacciones se dan procesos de polimerización de los productos de reacción que suelen inhibir la superficie del electrodo.

#### ***1.4.4.2. Biosensores de segunda generación***

La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo (Gorton *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2003) (**Figura 1.8**).



**Figura 1.8.** Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de segunda generación.

El mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural de la enzima, asimismo no debe reaccionar con el analito ni con otros componentes de la muestra. También es necesario que tenga buenas propiedades electroquímicas, por ejemplo un potencial redox próximo a cero, con lo que se consiguen eliminar las reacciones redox de posibles interferentes (Chaubey and Malhotra, 2002). Además, este potencial debe ser compatible con el potencial redox del sitio activo de la enzima. Los mediadores redox pueden formar parte del mecanismo de transducción a través de distintas formas, por ejemplo, pueden estar en solución, formando parte de un polímero redox, o unidos a la porción proteica de la enzima.

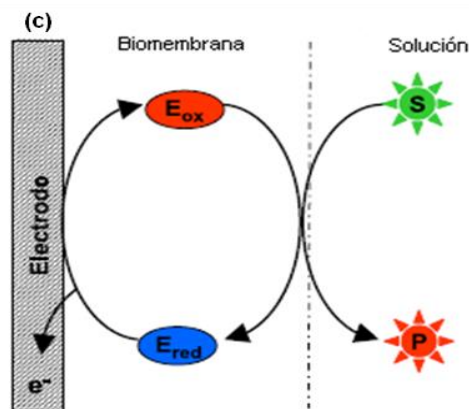
Los mediadores más utilizados, libres en solución o inmovilizados junto con las enzimas, son entre otros el par ferri/ferrocianuro, 1,4-benzoquinona, derivados del ferroceno, azul de Meldola y azul de metileno (Pravda, 1998).

### ***1.4.4.3. Biosensores de tercera generación***

La transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa. En los últimos años se han desarrollado diferentes

trabajos basados en este tipo de transferencia electrónica (Vengatajalabathy Gobi and Mizutani, 2001; Tian *et al.*, 2002) (**Figura 1.9**).

Una de las mayores dificultades en la construcción de este tipo de biosensor es cómo optimizar la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo. La gran mayoría de las enzimas tienen el centro activo en su interior; esto hace casi imposible un contacto directo entre éste y la superficie del transductor.



**Figura 1.9.** Esquema de los biosensores basados en óxido-reductasas de tercera generación.

La elección del tipo de biosensor, de 1<sup>era</sup>, 2<sup>da</sup> o 3<sup>era</sup> generación, dependerá, en parte, de la actividad electroquímica de los sustratos (S) y/o productos (P) de la reacción enzimática. Si S o P son electroquímicamente activos a potenciales relativamente bajos, es posible detectar la disminución de S o el incremento de P en forma directa (biosensores de 1<sup>era</sup> generación). La electroactividad de S o P a bajos potenciales es indispensable para evitar la interferencia de sustancias presentes en el medio capaces de oxidarse o reducirse sobre el electrodo al potencial de trabajo. Cuando esto no ocurre, se utilizan los mediadores redox (biosensores de 2<sup>da</sup> generación). El desarrollo de biosensores de 3<sup>era</sup> generación queda restringido a enzimas como la Peroxidasa de Rábano, en las cuales el sitio activo se encuentra expuesto en la superficie de la proteína (Pravda, 1998).



## **1.5. ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS**

En la actualidad los seres humanos están cada vez más preocupados por el consumo de alimentos saludables que les permitan mejorar su bienestar. El consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas ha crecido rápidamente en los últimos años como resultado del cambio de las actitudes de las personas al preferir alimentos más sanos (Rico *et al.*, 2006). En la actualidad, en el mercado dirigido a consumidores, existe una mayor oferta de productos mínimamente procesados a base de frutas y hortalizas frescas listas para consumir, tales como: ensaladas listas con aderezos, mezclas de brócoli, coliflor, zanahoria y de lechuga como base para ensaladas, fruta pelada y troceada, verduras peladas y troceadas para la preparación de sopas y platos, entre otros (Rico *et al.*, 2006).

### **1.5.1. Definición y clasificación**

Los alimentos frescos mínimamente procesados (MPF), son productos modificados físicamente con el objetivo de obtener alimentos listos para el consumo, pero permaneciendo en su estado "in natura", es decir que los tratamientos son poco intensos por lo cual no se alteran sus características intrínsecas. Entre estos productos se incluyen las frutas y hortalizas peladas, troceadas, lavadas y rebanadas mantenidas en refrigeración. Un vegetal fresco cortado de buena calidad presenta textura aceptable, apariencia fresca, buen olor y sabor, seguridad microbiológica y vida útil suficientemente larga que permita incorporar al producto dentro de un sistema de distribución (Rico *et al.*, 2006; Escobar Hernández, 2013).

El importante valor nutricional y económico de las frutas y de las hortalizas frescas ha sido ampliamente estudiado (Kaur and Kapoor, 2001; Rico *et al.*, 2006). Las frutas y las hortalizas son los mejores transportadores de vitaminas, minerales esenciales, fibra dietaria, antioxidantes fenólicos, glucosinolatos y otras sustancias bioactivas. Además, proveen de carbohidratos, proteínas y calorías. Estos efectos nutricionales y promotores de la salud mejoran el bienestar humano y reducen el riesgo

de varias enfermedades. Por ello las frutas y las hortalizas son importantes para la nutrición, sugiriéndose una ingesta de cinco porciones por día.

Los alimentos MPF se pueden dividir en cinco gamas según el tipo o intensidad de proceso al que son sometidos (Skogerboe and Grant, 1970):

- ✚ *I Gama*: frutas y vegetales frescos sin ningún tipo de proceso.
- ✚ *II Gama*: frutas y hortalizas en conserva.
- ✚ *III Gama*: frutas y vegetales congelados.
- ✚ *IV Gama*: frutas y vegetales crudos, listos para ser consumidos, sin sus partes no comestibles, lavados, pelados y en formas trozadas, rebanadas o ralladas, posteriormente envasados en plásticos y conservados a temperaturas de refrigeración, garantizando una duración mínima de siete días para su consumo inmediato.
- ✚ *V Gama*: productos vegetales envasados al vacío, que se someten a un proceso térmico, para luego ser mantenidos en condiciones de refrigeración entre tres semanas y seis meses.

Es por ello que la IV Gama presenta las siguientes ventajas:

- ✚ Reducción del tiempo de preparación de comidas.
- ✚ Calidad uniforme y constante de los productos durante todo el año.
- ✚ Facilidad de acceso a productos saludables.
- ✚ Facilidad de almacenamiento por su presentación.
- ✚ Reducción del manejo, con lo cual aumenta la sanidad e higiene del producto.
- ✚ Aprovechamiento del producto al 100%, es decir, reducción de las pérdidas.
- ✚ Posibilidad de inspeccionar la calidad del producto en la recepción y antes de su consumo.

## 1.5.2. Estrés en alimentos mínimamente procesados

Levitt definió al estrés como cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos (Levitt, 1980). Además, el término “estrés” en términos biofísicos hace referencia a una fuerza ejercida sobre un objeto en relación con el área sobre la cual se aplica. Si este concepto es aplicado a los alimentos, se puede entender como la magnitud de presión ambiental que fuerza al cambio en la fisiología y en el metabolismo de un vegetal (Nielsen, 1998). El problema de las definiciones encontradas en la literatura radica en como determinar qué factor es desfavorable o qué respuestas poseen un efecto negativo o benéfico en los vegetales. Nilsen y Orcutt señalan que algunos factores pueden tener ambos efectos simultáneamente (Nielsen, 1998). Por ejemplo, el estrés generado por corte, si bien tiene un efecto negativo en la apariencia del vegetal, también puede ser positivo ya que genera una mayor cantidad de compuestos funcionales.

En este sentido, Lichtenthaler distingue tres conceptos (Lichtenthaler, 1996):

- ✚ *Estrés*: es el estado de una planta cuando se la somete a una fuerza.
- ✚ *Tensión o esfuerzo*: es la respuesta de la planta al estrés aplicado.
- ✚ *Daño*: es el resultado de un estrés de tal intensidad que no puede ser compensado por la planta.

Es importante destacar que, aunque el estrés y sus respuestas vinculadas puedan estar presentes, no siempre esto implica la existencia de daño, aun cuando el vegetal esté sujeto a períodos largos o incluso a estrés continuo.

Los diferentes tipos de estrés a los que son sometidos los alimentos MPF pueden ser clasificados en físicos, químicos y bióticos, siendo los dos primeros agrupados bajo el término de ‘estrés abiótico’. Entre los factores físicos se pueden mencionar el estrés hídrico, térmico, radiación UV y por corte. Entre los factores químicos son ampliamente estudiados la contaminación atmosférica, metales pesados, toxinas, salinidad etc. Finalmente, entre los factores bióticos pueden mencionarse la competencia, la alelopatía y patógenos en general.

### ***1.5.2.1. Estrés oxidativo y antioxidantes***

El oxígeno molecular en estado basal es relativamente poco reactivo, sin embargo, existen formas ‘activadas’ conocidas como “especies reactivas del oxígeno” (EROs) (Montenegro, 2004; Pisoschi and Pop, 2015). Son especies químicas altamente oxidantes que, dependiendo de su naturaleza, pueden dañar diversos componentes celulares tales como lípidos y proteínas.

Las EROs producidas en las células son eliminadas por diversos antioxidantes. Convencionalmente, éstos han sido clasificados como enzimáticos (enzimas como la catalasa, superóxidodismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, etc) y no enzimáticos (ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, etc), aunque en muchos casos ambos tipos de antioxidantes funcionan en forma coordinada (Kaur and Kapoor, 2001). Dichos antioxidantes se encuentran presentes en los alimentos, definiéndolos como “alimentos funcionales”, ya que además de aportar nutrientes, poseen sustancias encargadas de realizar funciones sobre la salud humana.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos, el ácido ascórbico ha sido reconocido como el antioxidante por excelencia y como un nutriente importante en varios productos alimentarios. La acción de la vitamina C es suministrada por el ácido L-ascórbico y su forma oxidada, el ácido deshidroascórbico (Londoño and De, 2012).

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas y debido a su estructura química poseen la capacidad de secuestrar radicales libres (Londoño and De, 2012).

Por lo que, es necesario tener en claro que cualquier tipo de estrés aplicado producirá una situación de daño oxidativo si la capacidad antioxidante es superada por la generación de EROs. Sin embargo, tanto la producción de EROs como la respuesta antioxidante es variable de acuerdo a la especie y la severidad del estrés. El estudio de los alimentos de IV Gama y el efecto del estrés aplicado es de vital importancia para poder desarrollar estrategias que permitan extender la vida útil de los mismos sin afectar

sus propiedades nutricionales y organolépticas para responder a la constante y creciente demanda de los consumidores.

Por lo tanto, considerando la relevancia actual para prolongar la vida útil de los alimentos de IV Gama, la detección de antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico y los polifenoles totales en alimentos MPF sometidos a estrés de tipo abiótico, se han elegido en la presente tesis como temas de estudio, los cuales se desarrollarán en capítulos posteriores.

## **1.6. ALGUNAS PROPIEDADES DE INTERÉS DE LOS NANOMATERIALES**

### **1.6.1. Arcillas**

El término arcilla se refiere, desde el punto de vista mineralógico, a un grupo de minerales, filosilicatos en su mayor parte, cuyas propiedades fisicoquímicas dependen de su estructura y de su pequeño tamaño de partícula (inferior a 2 mm). Estos materiales, presentan una estructura basada en el apilamiento de planos de iones oxígeno (O) e hidroxilos (OH<sup>-</sup>). Los grupos tetraédricos (SiO<sub>4</sub>)<sup>4-</sup> se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas, de extensión infinita y fórmula (Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)<sup>2-</sup>, que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos (Vaccari, 1998). En ellas los tetraedros se distribuyen formando hexágonos. El silicio tetraédrico puede estar, en parte, sustituido por aluminio (Al<sup>3+</sup>), hierro (Fe<sup>3+</sup>), magnesio (Mg<sup>2+</sup>), y más raramente por litio (Li), cromo (Cr), manganeso (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu) o cinc (Zn). Una unión similar puede ocurrir en la superficie opuesta de la capa octaédrica. Así, los filosilicatos pueden estar formados por dos capas: tetraédrica más octaédrica y se denominan bilaminares, 1:1; o bien por tres capas: una octaédrica y dos tetraédricas, denominándose trilaminares, 2:1. En algunos filosilicatos (esmeclitas, vermiculitas, micas, etc.) las láminas no son eléctricamente neutras debido a las sustituciones de unos cationes por otros de distinta carga. El balance de carga se mantiene por la presencia de cationes, cationes hidratados o grupos hidroxilo

coordinados octaédricamente, en el espacio existente entre dos láminas consecutivas. Las fuerzas que unen las diferentes unidades estructurales son más débiles que las existentes entre los iones de una misma lámina, por ese motivo los filosilicatos tienen una clara dirección de exfoliación, paralela a las láminas (Vaccari, 1999).

Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican en sus propiedades fisicoquímicas. Dichas propiedades derivan, principalmente, de:

- ✚ Su extremadamente pequeño tamaño de partícula (inferior a 2 mm).
- ✚ Su morfología laminar.
- ✚ Las sustituciones isomórficas.

Como consecuencia de estos factores, presentan, por una parte, un valor elevado del área superficial y, a la vez, la presencia de una gran cantidad de superficie activa, con enlaces no saturados. Por ello pueden interaccionar con diversas sustancias, en especial compuestos polares, por lo que tienen comportamiento plástico en mezclas arcilla-agua con elevada proporción sólido/líquido y son capaces en algunos casos de hincharse, con el desarrollo de propiedades reológicas en suspensiones acuosas. Por otra parte, la existencia de carga en las láminas se compensa, con la entrada en el espacio interlaminar de cationes débilmente ligados y con estado variable de hidratación, que pueden ser intercambiados fácilmente mediante la puesta en contacto de la arcilla con una solución saturada en otros cationes. A esta propiedad se la conoce como capacidad de intercambio catiónico y es también la base de multitud de aplicaciones industriales (Newman and Bown, 1987).

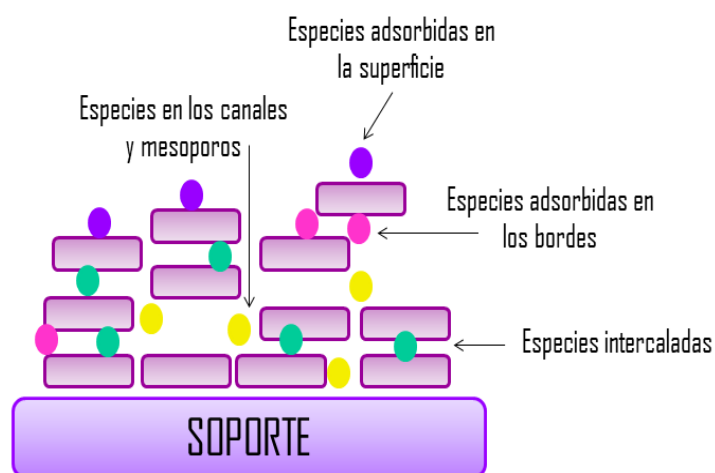
### ***1.6.1.1. Arcillas industriales***

Hoy en día las arcillas comerciales, aquellas que sirven como materia prima industrial, figuran entre los recursos minerales más importantes, tanto por el volumen explotado como por el valor de la producción. Un 90% de la producción se dedica, preferentemente a la fabricación de materiales de construcción y agregados. Sólo un 10% se dedica a otras industrias (fabricación de papel, caucho, pinturas, absorbentes,

decolorantes, arenas de moldeo, productos químicos y farmacéuticos, agricultura, etc.) (Vaccari, 1998, 1999). Estas últimas aplicaciones son las que transforman a las arcillas en materiales de interés para el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos, ya pueden emplearse como matrices para la adsorción de diferentes moléculas (Rao *et al.*, 2002) (**Figura 1.10**). Las arcillas más empleadas con este propósito son las esmectitas, cuyos nombres y fórmulas se muestran en la **Tabla 1.2** (Van Olphen and Fripiat, 1979; Newman and Bown, 1987).

**Tabla 1.2.** Diferentes tipos de esmectitas utilizadas en la modificación de electrodos.

Tipo de Arcilla	Nombre	Fórmula Genérica
Catiónica	Montmorillonita	$(Al_{2-x}Mg_x)Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)$
	Nontronita	$Fe_2^{3+}(Si_{4-x}Al_xO_{10})(OH)_2(Na_z^+, nH_2O)$
Diocahédrica		
Catiónica	Hectorita	$(Mg_{3-x}Li_x)Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)$
	Laponita	$(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)$
Triocahédrica	Vermiculita	$Mg_3(Si_{4-x}Al_xO_{10})(OH)_2(Na_x^+, Ca_x^{2+}, nH_2O)$
	Montmorillonita	$(Al_{2-x}Mg_x)Si_4O_{10}(OH)_2(Na_x^+, nH_2O)$
	Nontronita	$Fe_2^{3+}(Si_{4-x}Al_xO_{10})(OH)_2(Na_z^+, nH_2O)$



**Figura 1.10.** Posibles sitios de adsorción en un gel de arcilla.

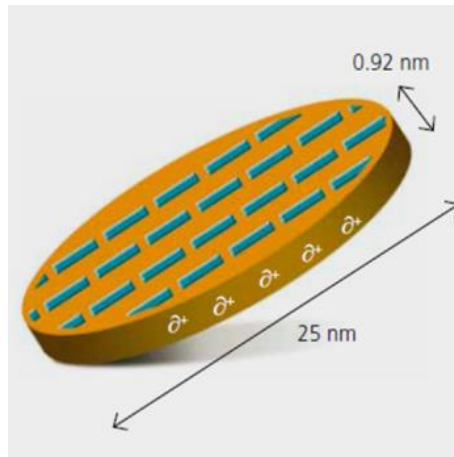
De hecho, uno de los problemas más comunes que presentan estos sólidos no conductores es la limitada capacidad de transporte de carga que exhiben, relacionada tanto con la transferencia electrónica, como con la difusión física de iones a través de conductos o canales, en el interior de la película de arcilla (Yao *et al.*, 1998a; Yao *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1998c). Este transporte se ve favorecido mediante un proceso de delaminación de la arcilla, el cual da lugar a una película con estructura menos ordenada y consecuentemente, con mejor acceso a los componentes solubles a través de conductos o canales. Estos incrementos de permeabilidad se pueden lograr mediante diferentes estrategias, por ejemplo empleando arcillas de tamaño de partícula pequeño (laponita en lugar de montmorillonita) (Falaras *et al.*, 2000; Carrero and León, 2001), o incluyendo polímeros o materiales conductores, como el polipirrol (Faguy *et al.*, 1994) o el  $V_2O_5$  (Anaissi *et al.*, 1999).

A pesar de la limitación en lo que respecta a la transferencia electrónica, se han encontrado diversas aplicaciones para los electrodos modificados con arcillas, tales como electrocatalizadores, fotocatalizadores, sensores y biosensores (Oyama and Anson, 1986; Ouyang and Wang, 1998; Cosnier *et al.*, 2000; Morigi *et al.*, 2001).

#### *1.6.1.1.1. Laponita*

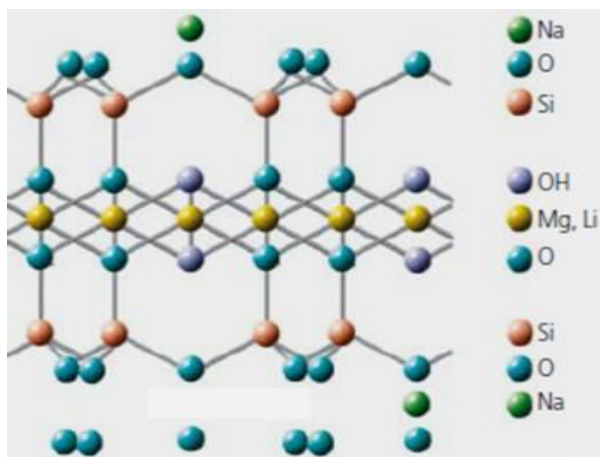
La laponita es un producto enteramente sintético. El proceso de síntesis involucra la combinación de sales de sodio, magnesio y litio, con silicatos de sodio, a velocidad y temperatura cuidadosamente controladas. Tiene una estructura laminar, y en dispersión acuosa se encuentra como cristales con forma de disco formando una suspensión coloidal (**Figura 1.11**). Se puede describir como un polímero inorgánico prácticamente en dos dimensiones.





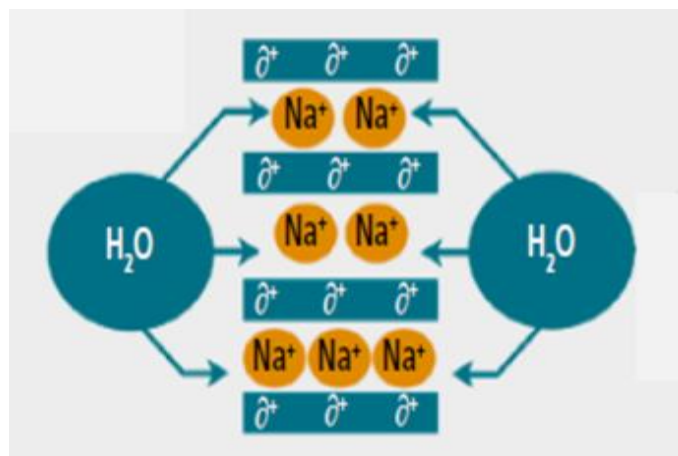
**Figura 1.11.** Forma y dimensiones características de un cristal de laponita, indicando las cargas superficiales.

La celda unitaria está constituida por seis iones magnesio en posición octaédrica, los que se ubican entre dos planos formados por cuatro átomos de silicio en posición tetraédrica (**Figura 1.12**). La celda unitaria se repite varias veces en dos direcciones, dando como resultado la forma de disco que presenta el cristal. Se ha estimado que un cristal típico de laponita contiene entre 30.000 y 40.000 celdas unitarias.



**Figura 1.12.** Estructura de la celda unitaria de la laponita.

Los bordes de los cristales tienen localizadas cargas positivas, típicamente de 4-5/100 mmol g<sup>-1</sup>. La superficie del cristal presenta una carga negativa de 50-55/100 mmol g<sup>-1</sup>. Esta carga negativa es neutralizada, durante el proceso de secado, por iones sodio que se adsorben sobre la superficie de los cristales. Los cristales se acomodan en pilas, y se mantienen unidos por interacciones electrostáticas, las que se generan por compartir iones sodio en la región interlaminar entre cristales. A 25° C, en agua y con rápida agitación, el proceso de dispersión se completa sustancialmente luego de diez minutos. La **Figura 1.13** muestra el proceso de delaminación de pilares de cristales de laponita, como consecuencia de la hidratación de los iones sodio, en las regiones interlaminares.



**Figura 1.13.** Sitios de incorporación de agua en el proceso de delaminación de las arcillas.

Una solución diluida de laponita en agua desionizada puede permanecer con baja viscosidad y sin interacción entre los cristales por un largo periodo de tiempo. Las interacciones electrostáticas atraen a los iones sodio desde la solución hacia la superficie del cristal, de esta manera se establece un equilibrio que mantiene a los iones sodio en una región próxima a la superficie de los cristales de laponita dando lugar a la formación de una doble capa eléctrica. Cuando dos partículas se aproximan, sus cargas iguales provocan la repulsión entre ambas y permiten que se mantengan en suspensión. La adición de compuestos polares a la solución (por ejemplo sales, surfactantes,

solventes coalescentes, etc.) provoca una disminución en el espesor de la doble capa, permitiendo que las cargas positivas de los bordes de los cristales interactúen con las cargas negativas en la superficie de éstos. Este proceso da lugar a la formación de una estructura tipo “castillo de naipes”, **Figura 1.14**. En este gel, las partículas floculadas se mantienen unidas por fuerzas electrostáticas débiles.



**Figura 1.14.** Estructura tipo “castillo de naipes” de los geles de laponita.

La deposición y el posterior secado de este sol acuoso sobre la superficie de un electrodo generan una película, cuya estructura resulta de un apilamiento más o menos ordenado de las “partículas elementales”. En presencia de un electrolito acuoso, de fuerza iónica alta, esta película puede reincorporar agua, expandiéndose como consecuencia. Este hecho permite la formación de un gel inorgánico que permanece adherido a la superficie del electrodo.

La laponita presenta una alta estabilidad térmica y química, induce limitaciones espaciales y efectos químicos superficiales, capaces de generar reactividades específicas y propiedades de selectividad (Coche-Guérente *et al.*, 1998) haciendo su uso particularmente atractivo en catálisis.

La inmovilización de enzimas en geles inorgánicos de laponita genera biomateriales que exhiben una actividad enzimática elevada, debido al significativo

carácter hidrofílico de la matriz huésped (Poyard *et al.*, 1996a, 1998; Senillou *et al.*, 1999). Sin embargo, la lenta liberación de las moléculas de enzima incorporadas en la película de laponita, requiere en algunos casos, la utilización de un entrecruzador químico o un agente pilar. En un principio, el glutaraldehído fue utilizado con este objetivo (Poyard *et al.*, 1998), sin embargo, su uso disminuyó la actividad de la enzima atrapada. Otra forma de evitar la liberación enzimática consiste en generar electroquímicamente un polímero o introducirlo dentro de los poros, microcanales y espacios de la película de laponita (Cosnier *et al.*, 2000). Ejemplo de ello son biosensores que involucran la inmovilización de diversas enzimas, tales como glucosa oxidasa (Poyard *et al.*, 1996b; Cosnier *et al.*, 2006), polifenoloxidasas (Fan *et al.*, 2007a) alcohol dehidrogenasa, colesterol oxidasa (Besombes *et al.*, 1995) y peroxidasa de rábano picante (Karim and Fakhrudin, 2012; Okawa *et al.*, 2015) en matrices inorgánicas de laponita.

## **1.7. POLÍMEROS ADN-BIOINSPIRADOS**

Los polímeros, son moléculas de elevada masa molecular cuya estructura está compuesta por la repetición de unidades derivadas de moléculas de bajo peso molecular, y pueden ser naturales o sintéticos (Anastas and Warner, 1998; Warner *et al.*, 2004). Estos últimos, se comenzaron a producir en el siglo XIX modificando químicamente polímeros naturales como caseína, goma laca, caucho natural y celulosa para convertirlos en materiales macromoleculares útiles y con nuevas propiedades. Los polímeros sintéticos han sido desarrollados para satisfacer necesidades humanas básicas tales como abrigo, salud, alimentación, comunicación, movilidad y protección (Decher, 1997). Sin embargo, las demandas generadas por una población mundial creciente, provocó problemas en la provisión de caucho natural debido a la guerra mundial y las nuevas tecnologías emergentes, lo que dio lugar al desarrollo de nuevos materiales que mostraron propiedades diferentes a las de cualquier biomaterial natural: los polímeros completamente sintéticos.

Con el boom de la petroquímica en los años 1950, comenzaron a estar disponibles una gran variedad de polímeros sintéticos. Sumado a esto, la explotación de materias primas como el petróleo y el gas natural para la producción de polímeros disminuyó significativamente los costos de producción y simplificó la manufactura de materiales macromoleculares (Jenkins *et al.*, 1996). El primer polímero completamente sintético fue producido en 1907 por Leo Hendrik Baekeland (Bakelita™) al hacer reaccionar fenol con formaldeído (Braun and Collin, 2010).

Todos estos compuestos poliméricos garantizaban un alto nivel de vida y sirvieron como indicadores de las nuevas tecnologías. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la durabilidad y resistencia que los hacía útiles, también aseguraba su persistencia en el medioambiente y dificultaban su degradación. Además, la producción de polímeros creció exponencialmente, produciéndose en los primeros 10 años del siglo XXI tantos plásticos como en todo el siglo XX (Thompson *et al.*, 2009; Muelhaupt, 2013). Es por ello que comenzaron a estudiarse nuevas estrategias para la fabricación de materiales. Es así como surge la Química Verde, la cual se inspiró en los diseños y estrategias presentes en la naturaleza (Ledesma *et al.*, 2015), y la cual se define como el diseño de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas (Sahoo *et al.*, 2017).

En 1998 Paul Anastas y John Warner postularon los Doce Principios de la Química Verde. Estos Principios de la Química Verde son “reglas de diseño” que ayudan a los químicos a obtener el objetivo intencional de sostenibilidad (Sahoo *et al.*, 2017). Además, estos principios son un marco de referencia para el diseño de nuevos productos y procesos químicos, que se aplican a todos los aspectos del ciclo de vida de un proceso, desde las materias primas utilizadas hasta la eficiencia y seguridad de la transformación y la toxicidad y biodegradabilidad de los productos y reactivos usados. Los Doce Principios de la Química Verde son (Anastas and Warner, 1998; Sahoo *et al.*, 2017):

- 🚧 **Prevención:** es mejor prevenir los desperdicios que tratarlos o limpiarlos luego de que han sido producidos.

- ✚ *Economía de átomos*: los métodos sintéticos deben diseñarse para maximizar la incorporación en el producto final de todos los materiales usados en el proceso.
- ✚ *Síntesis química menos peligrosa*: siempre que sea posible, las metodologías de síntesis deben diseñarse para usar y generar sustancias que sean lo más inocuas posible para la salud humana y el medioambiente.
- ✚ *Diseño de químicos más seguros*: los productos químicos deben ser diseñados para preservar la eficacia de la función al mismo tiempo que se reduzca su toxicidad.
- ✚ *Solventes y sustancias auxiliares más seguras*: el uso de sustancias auxiliares debe ser evitada cuando sea posible y, de no hacerlo, deben ser inocuas.
- ✚ *Diseño para eficiencia energética*: los requerimientos energéticos de los procesos químicos deben ser minimizados. Siempre que sea posible, los métodos sintéticos deben conducirse a temperatura y presión ambientes.
- ✚ *Uso de materias primas renovables*: siempre que sea técnica y económicamente práctico las materias primas deben ser renovables.
- ✚ *Reducción de derivados*: la derivatización innecesaria (uso de grupos bloqueadores, protección, etc.) debe ser minimizada o evitada de ser posible, debido a que tales etapas requieren reactivos adicionales y pueden generar residuos.
- ✚ *Catálisis*: los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
- ✚ *Diseño para degradación*: los productos químicos deben ser diseñados para que al finalizar su función se descompongan dando lugar a productos de degradación inocuos y no persistentes en el ambiente.
- ✚ *Análisis en tiempo real para prevenir contaminación*: las metodologías analíticas deben ser desarrolladas para permitir el monitoreo y control en tiempo real para prevenir la formación de sustancias peligrosas.
- ✚ *Una química inherentemente más segura para la prevención de accidentes*: las sustancias y las formas de una sustancia usadas en un proceso químico deben escogerse adecuadamente para minimizar la

posibilidad de que se produzcan accidentes químicos incluyendo liberaciones de sustancias tóxicas, explosiones e incendios.

Durante décadas se ha realizado una extensa investigación para diseñar polímeros sintéticos que contienen bases de ácidos nucleicos (Takemoto, 1976). La funcionalización de polímeros usando bases de ácidos nucleicos (bases ADN) es de particular interés debido a su capacidad de formar complejos entre bases complementarias mediante interacciones de enlace hidrógeno (Dahman *et al.*, 2003). Además, se sabe que bases adyacentes de timina y/o citosina en diferentes partes del ADN pueden dar lugar a reacciones de dimerización en presencia de luz ultravioleta (UV,  $\lambda \approx 280$  nm). Esta propiedad fotoquímica de los residuos de timina, que es dañino en el caso del ADN, puede ser usado para el desarrollo de materiales poliméricos en los cuales el foto-entrecruzado foto-inducido es ventajoso (Cheng *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2004; S. Trakhtenberg *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2005; Martino *et al.*, 2008).

Estos polielectrolitos bioinspirados conteniendo timina son similares al poliestireno (PS), excepto que grupos timina y grupos cargados se unen químicamente a la estructura base del PS (Casis *et al.*, 2007). El grupo vinil-estireno brinda la habilidad de copolimerizar el monómero con una amplia variedad de otros monómeros, incluyendo estirenos, dienos y acrílicos. Esta versatilidad da la posibilidad de preparar timinas poliméricas cuya solubilidad va desde ser solubles en agua a solubles en solventes orgánicos o directamente insolubles.

En este contexto surge el monómero sintético de 4-vinilbenciltimina (VBT) para la fabricación de polielectrolitos bioinspirados. Las características del VBT puede entonces impartir a los copolímeros resultantes propiedades interesantes (Cheng *et al.*, 1995):

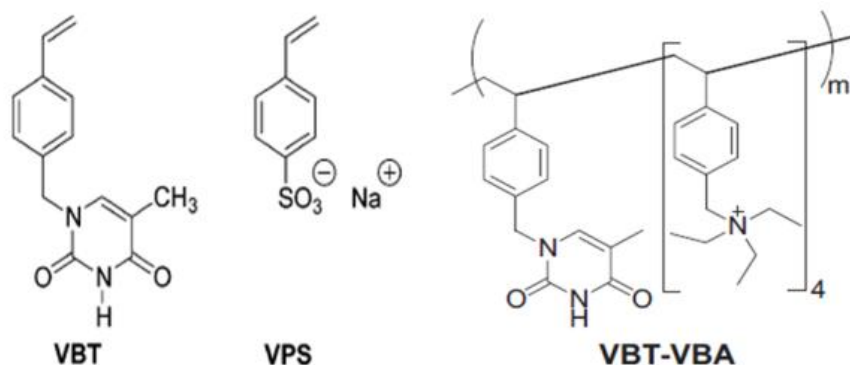
- ✚ Una unión químicamente estable entre el grupo estireno y el residuo de timina.
- ✚ Un anillo de benceno como espaciador entre la timina y el esqueleto puede originar interacciones de apilamiento tipo  $\pi$ - $\pi$ .
- ✚ La capacidad de formar enlaces hidrógeno con otras moléculas o consigo misma para aumentar la resistencia de un polímero.

- ✚ El nitrógeno del grupo imida tiene un pKa de alrededor de 9. Cuando se ionizan por encima de pH 10, los polímeros se hinchan y forman un complejo polielectrolítico con policationes.
- ✚ El nitrógeno del grupo imida puede ser sometido a un proceso de alquilación o ser bloqueado reversiblemente para formar polímeros más solubles. También permite unir covalentemente un grupo funcional que luego puede ser incorporado al polímero.
- ✚ Los polímeros o copolímeros son fotosensibles y pueden ser entrecruzados con luz UV brindando una manera adicional de mejorar las propiedades del material.

La adaptabilidad del VBT lo hace un monómero atractivo, debido a que el balance entre la fotorreactividad, la solubilidad y las interacciones no covalentes puede modularse para una amplia variedad de aplicaciones. Además, la existencia de mecanismos naturales que revierten la reacción de foto dimerización y restauran los polímeros a su estado original brinda oportunidades interesantes para crear materiales reciclables (Whitfield *et al.*, 2005). Algunas de las aplicaciones de polímeros conteniendo el monómero VBT son productos de cuidado capilar (Warner *et al.*, 2004), coberturas eléctricas conductivas (Trakhtenberg *et al.*, 2005), superficies antibacteriales (Warner *et al.*, 2003), liberación controlada de drogas (Dahman *et al.*, 2003), plásticos reciclables (Warner *et al.*, 2003; Whitfield *et al.*, 2005), foto resistores (Trakhtenberg *et al.*, 2005), y la fabricación de componentes electrónicos y placas de circuitos impresos (Casis *et al.*, 2007). Sin embargo, el homopolímero de VBT es insoluble en agua debido a sus fuertes interacciones moleculares (principalmente puente hidrógeno). La copolimerización del VBT con estirenos sustituidos con grupos catiónicos o aniónicos, tales como vinilbencil trietilamonio (VBA) o vinilfenil sulfonato (VPS), da como resultados copolímeros solubles en agua, en función de la proporción de monómeros (Martino *et al.*, 2008), como se muestra en la **Figura 1.15** Además de la gran variedad de aplicaciones posibles, estos polímeros son amigables con el ambiente, ya que cumplen con los Doce Principios de la Química Verde (Anastas and Warner, 1998) es un material que requiere de baja energía para su procesamiento, no tóxico, soluble en agua y biodegradable (Martino *et al.*, 2008); es por ello que en los últimos años han



cochado importancia como un nanomaterial óptimo para la construcción de biosensores (Paz Zanini *et al.*, 2013; Tulli *et al.*, 2018).



**Figura 1.15.** Estructuras químicas de los polímeros VBT-VPS y VBT-VBA.

## 1.8. NANOPARTÍCULAS DE ORO

En los últimos años, las nanopartículas metálicas han atraído una atención considerable, especialmente en investigaciones biológicas y químicas, debido a que exhiben propiedades mecánicas y químicas muy distintas en comparación a los materiales con un tamaño de grano micrométrico y de la misma composición. Es por ello que, mediante la disminución del tamaño de grano es posible modificar las propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas, químicas (reactividad), entre otras (Daniel and Astruc, 2004). Además, las nanopartículas pueden actuar como pequeños centros de conducción para facilitar la transferencia de electrones (Shipway *et al.*, 2000; Bharathi *et al.*, 2001; Ferapontova *et al.*, 2001).

En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) son las nanopartículas metálicas más estables y se han estudiado ampliamente (**Figura 1.16**). Hasta ahora, se han informado y revisado varios métodos para la preparación de AuNPs, que incluyen reducción química, fotólisis, radiólisis, reducción mediante sonoquímica y termólisis, métodos de síntesis de dos fases, etc. (Roucoux *et al.*, 2002). Entre ellos, el método más utilizado es la reducción química en la que se produce la reducción de una sal de Au

(III) en presencia de un agente estabilizante o protector, generalmente citrato o algún tiol, el cual se une a los átomos de oro expuestos en la superficie de la nanopartícula. Este agente protector determina la carga electrostática superficial de la nanopartícula (positiva o negativa), y a su vez, estabiliza la suspensión coloidal debido a que previene el crecimiento descontrolado y la agregación de las nanopartículas. Los ligandos lábiles, tales como el citrato, pueden ser reemplazados por biomoléculas mediante reacciones de intercambio, siempre que las moléculas biológicas formen asociaciones más estables (Kopple, 1980; Watson *et al.*, 1998).



**Figura 1.16.** AuNP de diferentes tamaños.

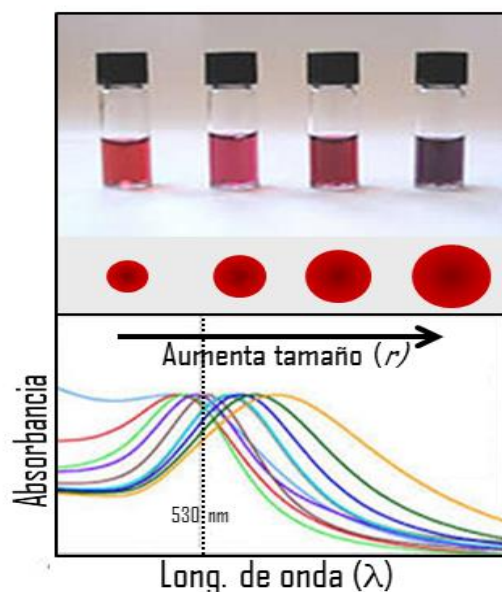
### **1.8.1. Plasmones superficiales de nanopartículas metálicas**

Dado que el diámetro de una nanopartícula se encuentra en el orden de la longitud de onda de la radiación electromagnética incidente, esta última es capaz de interactuar con la partícula y generar un movimiento colectivo de los electrones en dirección opuesta respecto de las cargas positivas en la estructura de metal. Esto provoca la localización de las cargas negativas a un lado de la superficie de la nanopartícula y las cargas positivas en el lado opuesto. La atracción entre estas cargas positivas y negativas actúa como fuerza restauradora, provocando la oscilación de los electrones de conducción. Si la frecuencia de la radiación de excitación se encuentra en

resonancia con la frecuencia de oscilación colectiva de estos electrones, aún una pequeña excitación da lugar a una fuerte oscilación. La frecuencia de resonancia depende principalmente de la separación de las cargas superficiales, del tamaño de las partículas y de la polarizabilidad del medio entre y alrededor de las cargas (Daniel and Astruc, 2004).

Una de las consecuencias más destacadas de la excitación de los plasmones de las nanopartículas es el color característico que exhiben las nanopartículas de los metales nobles. Este color depende del tamaño, forma y ambiente de las nanopartículas (Shipway *et al.*, 2000; Ferapontova *et al.*, 2001). La relación (dispersión/absorción) cambia significativamente con el tamaño. Las partículas grandes dispersan la luz de forma eficiente, mientras que el color de las partículas pequeñas es causado principalmente por la absorción. Dado que el color de la mayoría de las sustancias fuertemente coloreadas se debe principalmente a la absorción; la dispersión es generalmente despreciada, y los cambios en la transmisión, se atribuyen únicamente a la absorción. Para partículas metálicas con dimensiones mayores a 30 nm, la dispersión se vuelve más importante (Bharathi *et al.*, 2001).

La resonancia de los plasmones depende explícitamente del tamaño de las partículas, a través del radio ( $r$ ). A medida que aumenta  $r$ , el máximo de absorción de la banda de plasmones se corre hacia longitudes de onda mayores. El incremento, tanto de la longitud de onda de absorción como del ancho de la banda con el tamaño de la partícula, ha sido corroborado experimentalmente en diversas investigaciones (Link and El-sayed, 2000b; Jain *et al.*, 2007). Los cambios en el espectro de absorción de diferentes nanopartículas se observan en la **Figura 1.17**.



**Figura 1.17.** Suspensiones coloreadas, tamaño y espectros de absorción UV-visible para AuNPs de diferentes tamaños en citrato de sodio.

## 1.8.2. Nanopartículas de oro recubiertas de polímeros

Como se mencionó anteriormente, para evitar la agregación de la suspensión coloidal de nanopartículas se utilizan agentes estabilizantes como los tioles, surfactantes, polímeros y dendrímeros, posibilitando el control del tamaño de partícula y la funcionalización de su superficie (Belloni, 1996; Chen, 1999; Sohn *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004).

Los polielectrolitos se utilizan a menudo para modificar la superficie de las nanopartículas debido a que la atracción electrostática favorece la interacción entre esta macromolécula y la superficie (Decher, 1997). Es por ello que muchas investigaciones han dirigido sus estudios a la estabilización de las nanopartículas con diversos polímeros, obteniéndose nanoestructuras con propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas superiores a las del polímero y las nanopartículas originales (Croce *et al.*, 1998; Huynh *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000). Las nanopartículas metálicas dispersas en matrices poliméricas muestran una mayor estabilidad, una síntesis mejorada, y la

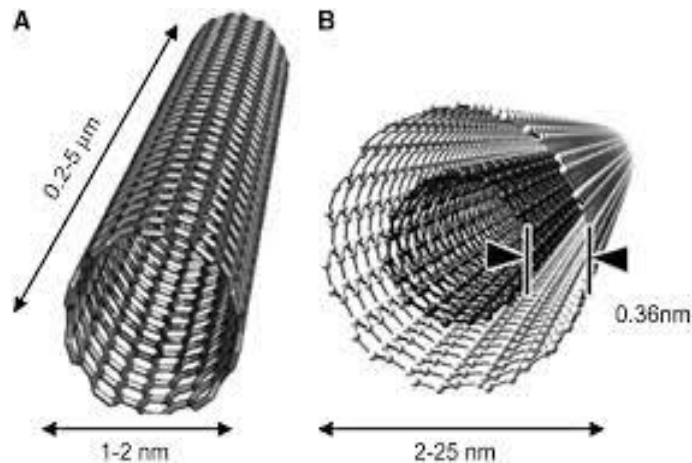
solubilidad en una variedad de solventes (Shenhar *et al.*, 2005). Por lo tanto, las nanopartículas estabilizadas con polielectrolitos pueden ser utilizadas en la detección selectiva de vapores (Krasteva *et al.*, 2002), en catálisis, o para la construcción de biosensores (Sun *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006) debido a sus excelentes propiedades.

### ***1.8.2.1. Nanopartículas de oro recubiertas de cloruro de dialildimetilamonio***

Un grupo especial de polímeros que ha cobrado mucha importancia en las últimas décadas, es el de los polímeros sintéticos aniónicos, catiónicos y anfóteros solubles en agua. Entre estos, los compuestos poliméricos de amonio cuaternario han sido históricamente los polielectrolitos catiónicos más importantes y más utilizados. Los primeros polímeros de amonio cuaternario de interés técnico se sintetizaron a partir de cloruro de dialildimetilamonio (PDDA) (Wandrey *et al.*, 1999). Este polímero posee una estructura química única y aplicabilidad versátil (Butler *et al.*, 1956; Fred Hoover, 1970). Los grupos de amonio cuaternario altamente hidrofílicos proporcionan al polímero una alta solubilidad en agua y las propiedades de la solución se corresponden con las de los polielectrolitos (Ottewill and Ryan, 1980; Jäger *et al.*, 1989). Las principales aplicaciones industriales están enfocadas en los procesos de floculación, deshidratación, coagulación, retención, flotación y separación. Sin embargo, se han informado otras aplicaciones emergentes en los últimos años, como por ejemplo su utilización como estabilizante de nanopartículas de oro, mostrando excelentes resultados (Chen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2014). En esta reacción, el PDDA actúa como un agente reductor y estabilizador para las AuNP, obteniendo soluciones coloidales muy estables con una estrecha distribución de tamaño (Chen *et al.*, 2006) y es por ello que son un excelente nanomaterial que puede ser utilizado para la construcción de biosensores (Chen *et al.*, 2006).

## 1.9. NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono (CNT) son materiales unidimensionales, con diámetros entre 1 y 2 nm (para los nanotubos de pared simple, SWCNT) y entre 2 y 30 nm (nanotubos de pared múltiple, MWCNT) y longitudes hasta 10  $\mu\text{m}$  (Jacobs *et al.*, 2010). Esto representa una relación de área/superficie de tres órdenes de magnitud, del que derivan gran parte de sus propiedades. En la **Figura 1.18** se presentan los SWCNT, que normalmente se encuentran formando haces, o los MWCNT como apilamientos de tubos concéntricos.



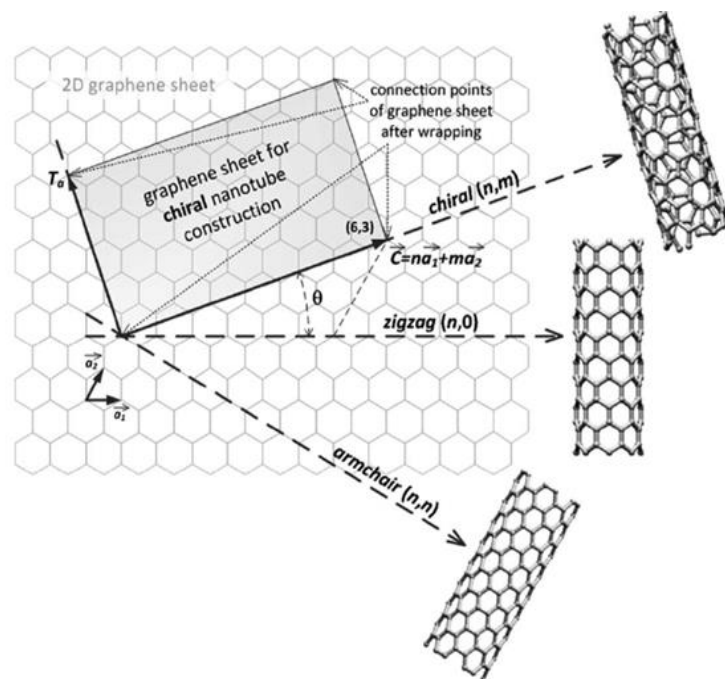
**Figura 1.18.** Tipos de CNT: (A) SWCNT (B) MWCNT.

Los resultados de los procesos de síntesis no son, lógicamente, las estructuras ideales como se encuentran representados en la **Figura 1.18** (Bose *et al.*, 2010). En primer lugar contienen impurezas, de naturaleza carbonosa, amorfa o grafitica y de naturaleza metálica, derivada de la presencia del catalizador empleado. En segundo lugar los CNT producidos varían en cuanto a su tipo (SWCNT, MWCNT), longitud y quiralidad y en tercer lugar, si bien estos materiales nanoestructurados poseen una estabilidad química, sus estructuras no son perfectas debido a que aparecen defectos en las redes, estrechamientos por cambio del radio del CNT, cerramientos terminales e inserciones, etc. Hay que advertir, sin embargo, que los defectos no son características

intrínsecamente negativas. Esto depende de la utilización que se pretenda dar a los CNT.

Dentro de las características estructurales mencionadas, una de las más importantes es la quiralidad, que se describe como la orientación de la red hexagonal respecto al eje del nanotubo. Definido el vector entre vértices diametrales de los hexágonos (**Figura 1.19**), en los casos extremos encontraremos uno de ellos paralelo (“zigzag”) o perpendicular (“armchair”). En los casos intermedios (“chiral”) la torsión de la red se define mediante el par (n,m) dónde, vectorialmente:

$$C = n_{a1} + m_{a2} \quad (\text{Ec. 1.7})$$



**Figura 1.19.** Distintas “quiralidades” de los CNT.

Donde  $m=n$  para armchair y  $m=0$  para zigzag. Estos parámetros, conocidos como índices de Hamada, son fundamentales debido a que, además del radio del CNT, afecta a la conductividad eléctrica y térmica. Como regla general, aquellos en que  $n-m$  = múltiplo de 3 son conductores y el resto semiconductores.

Todos los CNT de tipo armchair son conductores, mientras que los nanotubos tipo zigzag y quirales pueden ser conductores o semiconductores. En los CNT de tipo conductor el transporte de electrones es inmediato, lo que posibilita el transporte de corrientes a través de grandes distancias sin producir calentamiento en la estructura (Jacobs *et al.*, 2010). En los semiconductores se observa el comportamiento contrario.

Por otro lado, los CNT poseen excelentes propiedades mecánicas debido a que son las fibras más fuertes conocidas hasta el momento, con la capacidad de variar su forma acomodándose a la fuerza externa que provoca su deformación, sin que esto represente un cambio irreversible en su estructura molecular. Como aspecto adicional cabe citar su ligero peso frente al de otros materiales de características similares (Bose *et al.*, 2010).

Debido a todas las características mencionadas anteriormente, los CNT son nanomateriales atractivos para su aplicación en diversas áreas, como el desarrollo de biosensores, debido a que los electrodos conteniendo CNT generalmente tienen sensibilidades más altas, límites de detección más bajos y una cinética de transferencia de electrones más rápida que los electrodos de carbono tradicionales considerando varios trabajos publicados (Lien *et al.*, 2010; Osazuwa *et al.*, 2012).

### **1.9.1. Modificación superficial de los nanotubos de carbono**

Existen dificultades asociadas a la formación de dispersiones de CNT en varios solventes o matrices, las cuales están relacionadas con la naturaleza de los CNT y desempeñan un papel crucial en el rendimiento mecánico de un material determinado (Kim *et al.*, 2012). Es por ello que en los últimos años, los estudios se han centrado en la modificación superficial de los CNT para lograr dispersarlos en diferentes tipos de solventes.



La modificación superficial consiste en la incorporación de algún grupo funcional en la superficie de los CNT, alterando sus propiedades químicas, hidrofobicidad y reactividad. La solidez estructural y química de los CNT tiene dos fuertes implicancias: primero, que el grupo funcional asociado aporta una reactividad química diferente y modifica en gran medida las propiedades del CNT; segundo, que el propio proceso de modificación superficial es diferente y más factible en los puntos (los menos) donde la red presenta defectos estructurales.

Siguiendo este criterio tipificamos los modos de funcionalización (Kim *et al.*, 2012) cómo:

- ✚ *No covalente*: donde los enlaces son débiles tipo  $\pi$ - $\pi$  y que no modifican la estructura del CNT (Jiang *et al.*, 2003; Osazuwa *et al.*, 2012; Fujigaya and Nakashima, 2015). Pueden producirse en pared por adiciones de elementos orgánicos, biomoleculares o polímeros o en el interior por inclusiones de especies como metales, haluros, óxidos metálicos o fullerenos. Este tipo de funcionalización es interesante por su carácter reversible y, en aplicaciones biomédicas, para transportar principios activos que puedan fijarse a elementos biológicos determinados.
- ✚ *Covalente*: donde los enlaces son fuertes tipo  $\sigma$ , que introducen o aprovechan irregularidad en la red hexagonal. Por tanto, aunque pueden producirse en pared son más frecuentes en los defectos en los extremos de los CNT, y zonas de cambio de curvatura del CNT.

El método básico de funcionalización covalente parte de la generación de puntos de inserción, normalmente mediante tratamientos ácidos, que pueden combinarse con ultrasonidos (Kim *et al.*, 2012). Se produce la rotura de algunos enlaces en la pared y se ocupan típicamente con grupos carboxilo. De esta forma se produce la separación de los CNT debido a la repulsión electrostática entre los grupos carboxilo y se favorece la sustitución por los grupos funcionales con los que se requiere funcionalizar los CNT. Otro tipo de tratamientos, asociados habitualmente a grandes aportes de energía, a altas temperaturas, conducen a procesos aditivos diferentes a los carboxilados (Balasubramanian and Burghard, 2005) y permiten, asociadas igualmente a una segunda

fase de sustitución, modalidades diferentes de funcionalización. Otra vía para la funcionalización es la modificación electroquímica mediante la aplicación de corriente galvánica en una solución con moléculas dotadas de grupos nitrogenados (Bahr *et al.*, 2001). Los CNT así funcionalizados son muy reactivos.

La funcionalización no covalente de CNT se produce por el mismo mecanismo por el que éstos tienden a agregarse y tiene como primer efecto evitar dicha agregación y permitir su dispersión. Dicha interacción, débil en principio, se produce sobre toda la superficie del CNT y toma forma de recubrimiento.

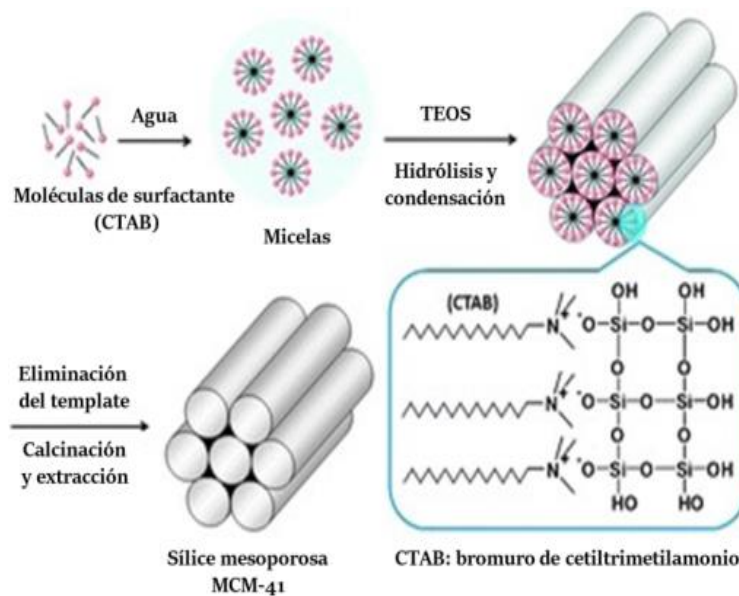
La modificación de las propiedades de los CNT derivada de su funcionalización es básica para muchas de sus aplicaciones actuales y potenciales, como por ejemplo el desarrollo de plataformas con excelentes características para el diseño de biosensores (Lien *et al.*, 2010; Osazuwa *et al.*, 2012).

## **1.10. MATERIALES MESOPOROSOS**

El conjunto de compuestos de sílice mesoporosa, llamados M41S (Beck *et al.*, 1992; Vartuli *et al.*, 1994), fue un descubrimiento importante en el área de materiales inorgánicos nanoestructurados con una distribución de tamaño de poro controlada.

En particular, el MCM-41 es uno de los materiales mesoporosos más atractivos debido a su estructura característica bien ordenada con una disposición hexagonal (Beck *et al.*, 1992). La estabilidad térmica, la gran área específica ( $>900 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y los poros uniformes con un diámetro controlable de 2-10 nm, han hecho que estos materiales sean altamente deseables en múltiples campos de aplicación (**Figura 1.20**). Sin embargo, los materiales mesoporosos silíceos puros no tienen suficientes actividades intrínsecas como catalizadores o propiedades magnéticas interesantes. En este sentido se ha encontrado que los iones metálicos también pueden implantarse en MCM-41 mediante diferentes métodos de síntesis. Por lo tanto, la aplicación de estos materiales se ha extendido a la catálisis, la adsorción y la separación, los láseres, los sensores, las células solares, la química huésped-huésped, la tecnología ambiental y el campo biomédico (Ho

*et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Sayari *et al.*, 2005). En este contexto, es pertinente mencionar la síntesis de compuestos mesoporosos que tienen elementos magnéticos incrustados en los nanocanales o en el marco poroso.



**Figura 1.20.** Síntesis y estructura de MCM-41.

Las partículas magnéticas nanométricas son extremadamente difíciles de sintetizar porque tienden a agregarse y/o unirse, perdiendo las propiedades específicas asociadas con las partículas cuando no interactúan entre sí. Sin embargo, cuando las nanopartículas se fabrican con un soporte sólido, que ofrece una superficie específica alta, la aglomeración de partículas magnéticas se puede inhibir completamente y la estabilidad de las nanopartículas pequeñas de metal y óxido de metal aumenta. Se pueden encontrar muchos trabajos que describen las propiedades magnéticas de MCM-41 con algunas composiciones particulares de hierro (Marchetti *et al.*, 1997; Bengoa *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2009; Gervasini *et al.*, 2009; Ursachi *et al.*, 2011). En este sentido, Ursachia *et al.* (Ursachi *et al.*, 2011) y Marchetti *et al.* (Marchetti *et al.*, 1997; Bengoa *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2009) han estudiado las propiedades magnéticas de las

nanopartículas de óxido de hierro dispersas dentro de la matriz de sílice mesoporosa preparadas por impregnación utilizando una solución acuosa de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ .

Hasta ahora, las investigaciones exhaustivas y sistemáticas sobre la naturaleza de las especies de hierro en términos de la carga del metal y su influencia en el comportamiento magnético son escasas. En este sentido, más allá de estudiar un método de post-síntesis para funcionalizar los silicatos MCM-41, se investigó sobre la naturaleza de las diferentes especies de hierro obtenidas como consecuencia de los procesos de anclaje y agrupamiento en la superficie del material mesoporoso, obteniéndose MCM-41-Fe, la cual depende de la carga de metal y está estrechamente relacionado con su comportamiento magnético (Cuello *et al.*, 2015).

Las propiedades estructurales y catalíticas únicas de las matrices de sílice mesoporosas para estructurar un entorno de transferencia electroquímica/electrónica y la resistencia a la biodegradación también han atraído una atención considerable (Z. H. Dai *et al.*, 2007). Como por ejemplo su utilización como matrices inmovilizadoras de proteínas a través de la acción física o química, debido a que poseen una gran área de superficie específica.

## **1.11. OBJETIVOS**

### **1.11.1. Objetivo general**

Diseñar y desarrollar (bio)electrodos utilizando materiales nanoestructurados, potencialmente aplicables a la cuantificación de polifenoles y ácido ascórbico en extractos vegetales sometidos a diferentes tipos de estrés abiótico.

### 1.11.2. Objetivos específicos

- ✚ Desarrollar (bio)sensores amperométricos basados en materiales nanoestructurados para la cuantificación de ácido ascórbico y polifenoles.
- ✚ Inmovilizar enzimas tales como la peroxidasa de rábano, en matrices nanoestructuradas orientadas a su utilización como plataformas sensoras de polifenoles.
- ✚ Estudiar la respuesta electroquímica de los (bio)sensores desarrollados en extractos vegetales, evaluando efectos de matriz y posibles interferentes.
- ✚ Analizar cambios de contenido tanto de ácido ascórbico como de polifenoles en relación a los diferentes factores de estrés externos aplicados.



# PARTE II

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN





# Capítulo 2

---

## Diseño y desarrollo de un biosensor enzimático para la detección de polifenoles

### 2.1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluidos los alimentos frescos y las bebidas (El Gharras, 2009) y su ingesta es beneficiosa para la salud debido a su actividad antioxidante, eliminando radicales libres (Ambigaipalan, 2015). Por lo tanto, es crucial el desarrollo de métodos analíticos que permitan una detección y cuantificación precisa y altamente sensible de polifenoles en matrices de alimentos y/o muestras con una preparación mínima (Ignat *et al.*, 2011).

Como se mencionó en el Capítulo 1, los biosensores amperométricos enzimáticos pueden ser una excelente alternativa para la detección de polifenoles debido a sus destacadas características (Korkut *et al.*, 2008; Eremia *et al.*, 2013; Raghu *et al.*,

2013; Touloupakis *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Es por ello que el desempeño de un biosensor es de suma importancia y depende de las propiedades fisicoquímicas de la matriz de inmovilización donde se encuentra la enzima. En este sentido, la plataforma debe poseer estabilidad mecánica, buena conductividad eléctrica, y posibilitar la permeabilidad tanto de los sustratos involucrados como de productos y cofactores. Con respecto a estos puntos, en estudios previos se ha demostrado el éxito de la inmovilización de las enzimas lactato oxidasa (Paz Zanini *et al.*, 2013) y glucosa oxidasa (Paz Zanini *et al.*, 2016) usando películas de hidrogel hechas de laponita y policationes ADN-bioinspirados, cuyas propiedades fueron descriptas en el Capítulo 1. Este efecto se debe a las interacciones electrostáticas y/o no electrostáticas, como por ejemplo puentes de hidrógeno, que producen fuerzas de interacción adicionales mejorando la estabilidad de los bioelectrodos (Paz Zanini *et al.*, 2016).

En el presente capítulo, se describe el diseño y desarrollo de un biosensor amperométrico enzimático mediante la inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano picante en hidrogeles de laponita conteniendo policationes y nanopartículas de oro, con el objetivo de mejorar las propiedades electroanalíticas del bioelectrodo. La composición del hidrogel y las condiciones experimentales fueron optimizadas en relación a la respuesta electroanalítica del biosensor hacia la oxidación de hidroquinona y/o ácido clorogénico y, posteriormente, fue aplicado a la detección del contenido de polifenoles totales en muestras de café verde y yerba mate.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Materiales**

La Laponita RD, una hectorita sintética (capacidad de intercambio catiónico monovalente, c.e.c. =  $0,74 \text{ meq g}^{-1}$ ) se obtuvo de Laportes Industries (Detroit, EE. UU.). El polvo liofilizado de peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7,  $193 \text{ U mg}^{-1}$ ), las nanopartículas de oro esféricas estabilizadas con buffer de citrato (diámetro 5 nm), la hidroquinona, la cafeína, los ácidos clorogénico, ascórbico, cítrico, glutámico y tartárico se adquirieron de Sigma-Aldrich SA. Las sales de sodio de buffer fosfato,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , para análisis, el peróxido de hidrógeno (30 vol) y la glucosa se obtuvieron de JT Baker. Los polímeros ADN-bioinspirados fueron obtenidos de un trabajo en colaboración<sup>1</sup>; donde la copolimerización de vinilbenciltimina (VBT) y vinilfenilsulfonato (VPS),  $\{[(\text{VBT})(\text{VPS})_{16}]^{16-}\}_{\approx 25}$  (nombrado como  $\text{P}^{16-}$ ) y el polimerización de cloruro de polivinilbencilamonio (pVBA) se llevó a cabo en un reactor bajo una atmósfera de nitrógeno de acuerdo al método utilizado por Warner y Dahman (Dahman *et al.*, 2003; Bianchini *et al.*, 2007) como se describió en el Capítulo 1.

El fundamento de las diferentes técnicas experimentales utilizadas a lo largo del presente trabajo de tesis se encuentran detalladas en la Parte III - Apéndice A.

### 2.2.2. Medidas electroquímicas

Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo con un potenciostato/galvanostato (Teq4, Buenos Aires, Argentina), equipado con un módulo analizador de impedancia. El análisis de los datos se realizó utilizando el software OriginPro 1.6 e Eissa\_0\_1b (para espectroscopía de impedancia electroquímica). Se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos, con un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$  (3 M) como electrodo de referencia. Como electrodos de trabajo, se utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCEs) modificados, según se indica en cada caso. Las soluciones de buffer fosfato 0,1 M, a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8 y 10), fueron utilizadas como electrolito soporte; mientras que la temperatura de trabajo fue de 25 °C.

Los voltamperogramas cíclicos fueron registrados entre -200 y 600 mV, a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>. Los estudios de cronoamperometría se realizaron bajo agitación mecánica, y la señal de la corriente obtenida se registró en función del

---

<sup>1</sup>Estos polímeros fueron obtenidos a través de una colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Débora Martino. Agradecemos el enorme aporte y colaboración.

tiempo en presencia de peróxido de hidrógeno después de la adición de alícuotas sucesivas de hidroquinona (HQ) o ácido clorogénico (CGA).

Las mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se llevaron a cabo utilizando una solución de una cupla rédox de  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM +  $K_4[Fe(CN)_6]$  5 mM preparada en KCl 0,1 M. La respuesta de impedancia en función de la frecuencia de perturbación se obtuvo aplicando un potencial con una amplitud de  $\pm 5$  mV a  $\pm 10$  mV, manteniendo así la condición de estado estacionario del sistema. Dicha perturbación fue aplicada en forma superpuesta con un potencial constante de polarización de 200 mV en un rango de frecuencias de 0,05 Hz - 10 kHz.

### **2.2.3. Mediciones espectroscópicas**

Los espectros de absorción UV-Vis se llevaron a cabo utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) en un rango de longitud de onda de 300-800 nm y 1  $\mu$ L de cada solución de hidrogel se utilizó para la determinación.

Los espectros IR se obtuvieron con un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier, Jasco FT/IR-4600 equipado con un accesorio ATR de reflexión única de punta de diamante utilizando un detector DTGS (de sus siglas en inglés: deuterated triglycine sulfate). Las películas de las muestras se prepararon depositando 2  $\mu$ L de cada solución y se dejaron secar hasta realizar cada medida. Los espectros de transmitancia se registraron en un intervalo de longitud de onda de 3500-650  $cm^{-1}$  a temperatura ambiente y en atmósfera purgada de  $N_2$  (Parker Balston 75-45). El análisis de los espectros se realizó utilizando el software Spectra Manager CFR, Jasco.

## 2.2.4. Preparación de los biosensores

Antes de cada experimento, las superficies de los GCEs se pulieron secuencialmente con polvo de alúmina de tamaño de partícula decreciente (1,0, 0,3 y 0,05  $\mu\text{m}$ ); luego se enjuagaron con abundante agua tridestilada y se sonicaron durante 1 minuto entre los pasos de pulido. Además, una suspensión coloidal de laponita se preparó dispersando 2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de la arcilla en agua con agitación continua durante toda la noche.

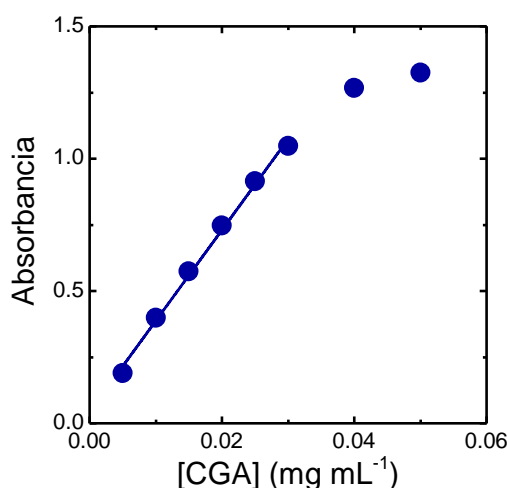
Los diferentes GCEs modificados se prepararon depositando una mezcla de 30  $\mu\text{g}$  de laponita, 15  $\mu\text{g}$  de los diferentes policationes basados en timina  $\{[(\text{VBT})_m(\text{VBA})_n]^{n+}\}_{\approx 25}$  con  $n=4, 8$  y  $16$ , (nombrados como  $\text{P}^{n+}$ ), 15 o 30  $\mu\text{g}$  de peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés Horse Radish Peroxidase) y diferentes cantidades de nanopartículas de oro (AuNP), expresadas en microgramos de oro por mililitro de solución o mezcla ( $\text{Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los electrodos modificados se secaron al aire a 25  $^{\circ}\text{C}$ , y se sumergieron en de buffer de fosfato 0,1 M pH 7 hasta el momento de ser utilizados.

## 2.2.5. Detección de polifenoles en muestras reales

La detección de polifenoles totales (PPh) se llevó a cabo en muestras de café verde y yerba mate, los cuales se adquirieron en un supermercado local. Para ello, se mezclaron 0,1 g de cada muestra con 10 mL de agua a 80  $^{\circ}\text{C}$ , se agitaron durante 10 minutos y luego se filtraron (Whatman® Grade 589/2). En todos los casos, la detección de polifenoles se llevó a cabo en el sobrenadante, y las concentraciones se determinaron mediante el método de adición estándar. Para ello se realizó el agregado sucesivo de dos alícuotas de CGA 0,85  $\mu\text{M}$ , con el objetivo de verificar que el aumento de la corriente sea proporcional a la concentración del estándar y asegurar que las mediciones realizadas se encuentren en la región lineal de la curva de calibración. Luego, para verificar los posibles efectos de la matriz, se midió la recuperación relativa de la señal

producida por una alícuota de CGA  $0,85 \mu\text{M}$  después de la adición de 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$  del sobrenadante (Mello *et al.*, 2003).

El método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) se utilizó para validar las determinaciones amperométricas. El reactivo de Folin-Ciocalteu que se emplea consiste en una mezcla de Wolframato y Molibdato de sodio en ácido fosfórico. Este reactivo oxida a los PPh presentes en la muestra, produciendo una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a 765 nm. La reacción es de tipo redox, por lo que además puede considerarse como un método de medida de la actividad antioxidante total. Los espectros de absorción UV-Vis se registraron usando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Palo Alto, CA, EE. UU.). Para esto, primero se realizó una curva de calibración (**Figura 2.1**), utilizando una solución estándar de ácido clorogénico de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Se mezclaron diferentes volúmenes entre 0 y 100  $\mu\text{L}$  con 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), manteniendo la mezcla durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y agua (en la cantidad necesaria para alcanzar un volumen final de 2 mL). La mezcla se sonicó durante 30 minutos y, finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm.



**Figura 2.1.** Curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu utilizando volúmenes entre 0 y 100  $\mu\text{L}$  de una solución estándar de de ácido clorogénico  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

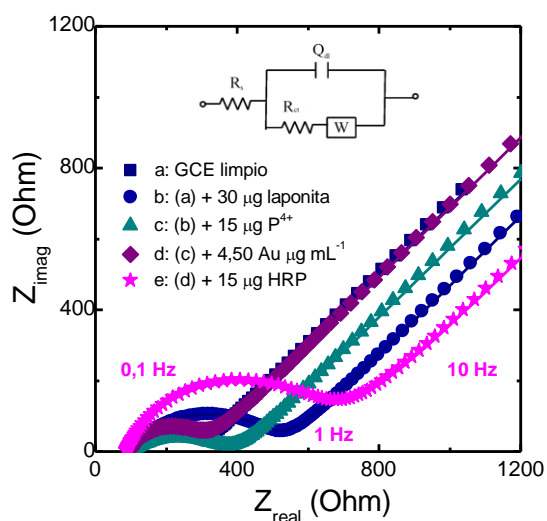
Para la detección de PPh en muestras reales, la yerba mate y el café verde se diluyeron cuatro veces en agua tridestilada y se trataron de manera similar a la descrita anteriormente utilizando 350  $\mu\text{L}$  de muestra.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Optimización de la composición del hidrogel

Las modificaciones realizadas en la superficie de los GCEs mediante los diferentes nanomateriales y/o la mejora de las propiedades eléctricas interfaciales, se estudiaron utilizando la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). En la **Figura 2.2** se observan los diagramas de Nyquist, en los que se graficó la componente real de la impedancia ( $Z_{\text{real}}$ ) en el eje  $x$  en función de la componente imaginaria ( $Z_{\text{imag}}$ ) de la impedancia en el eje  $y$  en el rango de frecuencia estudiado. Se distinguen diferentes regiones: i) en la zona de frecuencias altas e intermedias un semicírculo capacitivo conteniendo los componentes RC del sistema, el cual está relacionado con procesos controlados por la transferencia de carga y cuya intersección con el eje  $x$  permite obtener los valores de  $R_s$  y  $R_{ct}$ ; ii) una línea recta en la zona de frecuencias bajas. La impedancia del sistema bajo estudio puede ser representada adecuadamente mediante el circuito equivalente mostrado en el **inserto de la Figura 2.2**, donde  $R_s$  representa a todas las componentes de la resistencia óhmica presentes en el sistema;  $Q_{dl}$ , es el elemento de fase constante que representa a la capacidad de la doble capa;  $N$  nos da una idea de cuán similar es  $Q_{dl}$  a una capacidad ideal y tiene valores entre 0 y 1, siendo éste último el valor para una capacidad ideal;  $R_{ct}$  es la resistencia a la transferencia de carga; y  $W$ , la impedancia de Warburg.

Los experimentos de EIS se llevaron a cabo tras las modificaciones sucesivas de los GCEs, como se describe a continuación: (a) GCE limpio, (b) 30  $\mu\text{g}$  de laponita; (c) 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ ; (d) 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; y (e) 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ +15  $\mu\text{g}$  de HRP.



**Figura 2.2.** Diagrama de Nyquist en una solución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM (KCl 0,1 M) para **a)** GCE limpio y los GCE modificados desde **b)** a **e)**. **Inserto:** Circuito equivalente.

De los resultados óptimos de los ajustes se obtuvieron los valores de los diferentes parámetros, que se muestran en la **Tabla 2.1**, y se observó que sólo los cambios en la resistencia de transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) fueron significativos y sensibles a la composición de la interfaz del electrodo.

**Tabla 2.1.** Parámetros ajustados para el circuito equivalente en una solución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM (KCl 0,1 M) para **a)** GCE limpio y los GCE modificados desde **b)** a **e)**.

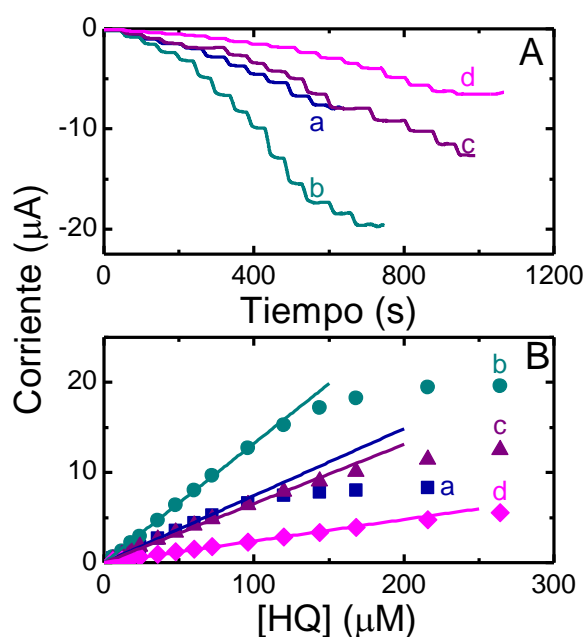
Composición del electrodo	$R_s$ ( $\Omega$ )	$Q$ ( $\mu\text{F}$ )	N	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )	$W \times 10^3$ ( $\Omega$ )
<b>a)GCE</b>	$116 \pm 1$	$4,7 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,1$	$180 \pm 3$	$0,44 \pm 0,01$
<b>b)GCE/laponita</b>	$101 \pm 1$	$13 \pm 1$	$0,9 \pm 0,1$	$433 \pm 4$	$0,43 \pm 0,01$
<b>c)GCE/laponita/<math>\text{P}^{4+}</math></b>	$109 \pm 2$	$15 \pm 2$	$0,9 \pm 0,1$	$333 \pm 2$	$0,42 \pm 0,01$
<b>d)GCE/laponita/<math>\text{P}^{4+}</math>/AuNP</b>	$102 \pm 1$	$7 \pm 1$	$0,9 \pm 0,1$	$205 \pm 3$	$0,45 \pm 0,01$
<b>e)GCE/laponita/<math>\text{P}^{4+}</math>/AuNP/HRP</b>	$107 \pm 4$	$4 \pm 1$	$1,0 \pm 0,1$	$579 \pm 7$	$0,40 \pm 0,01$



Para el caso del GCE modificado con laponita se observó un valor de  $R_{ct}=433 \Omega$  (**Figura 2.2 curva b**), el cual fue mayor comparado con el GCE limpio con una  $R_{ct}=180 \Omega$  (**Figura 2.2 curva a**). Considerando que la laponita tiene una carga superficial negativa al igual que la cupla rédox, al ser inmovilizada sobre la superficie del GCE y por un efecto de repulsión electrostática dificulta la transferencia electrónica desde  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  hacia la superficie del GCE. Sin embargo, la incorporación sucesiva de  $\text{P}^{4+}$  (**Figura 2.2 curva c**) y las AuNPs (**Figura 2.2 curva d**), disminuyó el valor de  $R_{ct}$  a  $333 \Omega$  y  $205 \Omega$ , respectivamente. En presencia de  $\text{P}^{4+}$ , la reducción de  $R_{ct}$  puede explicarse en términos tanto de neutralización electrostática y/o formación de una estructura de hidrogel con mayor porosidad que en el caso de la película de laponita (Paz Zanini *et al.*, 2011). La reducción posterior de la  $R_{ct}$  mediante la inclusión de las AuNPs confirmó el incremento de la conductividad ejercido por las nanopartículas metálicas (Yeh *et al.*, 2012).

Finalmente, la incorporación de HRP (**Figura 2.2 curva e**) en la película de hidrogel aumentó nuevamente el valor de  $R_{ct}$  a  $579 \Omega$ . Este efecto también se ha observado en hidrogeles de laponita que contienen lactato oxidasa (Paz Zanini *et al.*, 2011) y polifenol oxidasa (Fan *et al.*, 2007b), y se atribuye al obstáculo de la biomolécula hacia la transferencia de electrones de la cupla redox, confirmando la inmovilización de la enzima sobre la superficie del GCE.

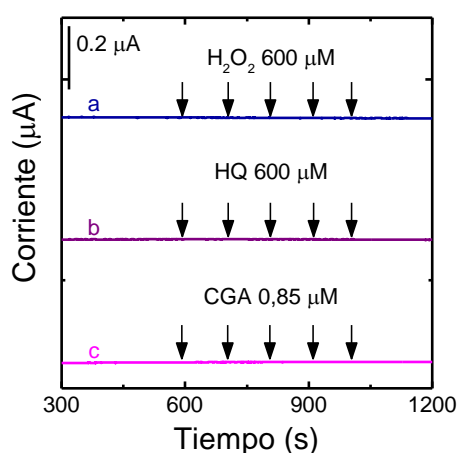
La respuesta de los GCEs modificados con los hidrogeles conteniendo diferentes cantidades de AuNPs, se obtuvo midiendo las corrientes estacionarias a  $-100 \text{ mV}$  en una celda electroquímica conteniendo  $600 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con una solución de buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  a  $\text{pH } 7$  luego de la adición de alícuotas sucesivas de HQ (**Figura 2.3 A**). La sensibilidad ( $s$ ) de los bioelectrodos se calculó a partir de las correspondientes pendientes en la zona lineal de la regresión lineal de los gráficos de las corrientes estacionarias en función de las concentraciones de HQ (**Figura 2.3 B**). Se observó que la mayor sensibilidad se obtuvo para el GCE modificado con  $30 \mu\text{g}$  de laponita+ $15 \mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ + $15 \mu\text{g}$  de HRP + $4,50 \mu\text{g}$  de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 2.3.** (A) Cronoamperogramas y (B) curvas de calibración para HQ con  $\text{H}_2\text{O}_2$   $600 \mu\text{M}$  en buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  a  $\text{pH } 7$  para los GCEs modificados con  $30 \mu\text{g}$  de laponita +  $15 \mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$  +  $15 \mu\text{g}$  de HRP y diferentes cantidades de AuNPs: **a)** ninguna, **b)**  $4,50$ , **c)**  $9,00$ , y **d)**  $13,5 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Potencial de trabajo:  $-100 \text{ mV}$ .

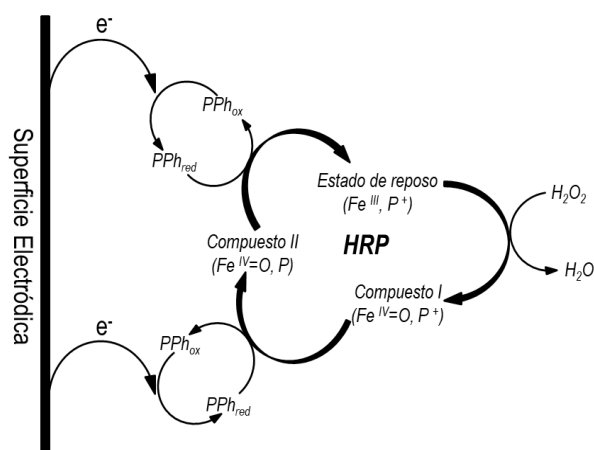
Sin embargo, para corroborar que la corriente de reducción observada mediante la adición de los PPh correspondía al proceso enzimático en el bioelectrodo, se realizaron experimentos de control en los que se añadieron alícuotas de HQ o CGA en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y viceversa (**Figura 2.4**). Bajo tales condiciones experimentales, no se observó señal amperométrica en ningún caso. Por lo tanto, la corriente observada está asociada a la reducción de los productos polifenólicos oxidados ( $\text{PPh}_{\text{ox}}$ ) resultantes de la oxidación enzimática previa (**Figura 2.5**). El típico mecanismo de reacción de los biosensores basados en la HRP implica una reacción enzimática cíclica en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que da como resultado la formación de HRP oxidada ( $\text{HRP}_{\text{ox}}$ ), que se puede reducir electroquímicamente ( $\text{HRP}_{\text{red}}$ ) mediante una transferencia electrónica directa o a través de un mediador de transferencia electrónica (MET). En el caso del MET, la  $\text{HRP}_{\text{ox}}$  toma los electrones de los polifenoles reducidos ( $\text{PPh}_{\text{red}}$ ) en solución y los  $\text{PPh}_{\text{ox}}$  resultantes (quinonas o formas de radicales libres) se reducen a sus formas iniciales en la superficie del electrodo produciendo una corriente de reducción proporcional a la

concentración de los PPh en la solución, donde los intermedios enzimáticos correspondientes son el compuesto I (estado de oxidación +5) que comprende una especie de ferril ( $\text{Fe}^{\text{IV}+=\text{O}}$ ) y el compuesto II (estado de oxidación +4) (Ruzgas *et al.*, 1996). Este comportamiento se conoce como “ping-pong” o mecanismo de desplazamiento doble, en el que dos sustratos, como ser los PPh y  $\text{H}_2\text{O}_2$  están involucrados (Veitch, 2004).



**Figura 2.4.** Cronoamperogramas para los GCEs modificados con 30 µg de laponita+15 µg de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 Au µg  $\text{mL}^{-1}$ +15 µg de HRP en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para adiciones sucesivas (como se indica con las flechas) de: **a)**  $\text{H}_2\text{O}_2$  600 µM, **b)** hidroquinona 6 µM y **c)** ácido clorogénico 0,85 µM. Potencial de trabajo: -100 mV.

De acuerdo con la reacción enzimática cíclica de HRP mostrada en la **Figura 2.5**, el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  influye en la concentración de PPh a la que se alcanza la saturación de la enzima. Los resultados indicaron que para las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  inferiores a 600 µM el mecanismo enzimático estaba limitado por este último. Este comportamiento fue coincidente con los resultados anteriores que indicaban que a concentraciones más altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produce la inhibición de la enzima (Adediran and Lambeir, 1989).



**Figura 2.5.** Esquema del mecanismo de las reacciones enzimáticas y del electrodo involucrados en la respuesta del biosensor electroquímico de HRP para compuestos fenólicos. Adaptado de (Yang *et al.*, 2006).

La **Figura 2.6** muestra las sensibilidades (obtenidas de manera similar a la que se describió anteriormente) hacia HQ utilizando los GCEs modificados en diferentes condiciones experimentales. El efecto de la cantidad de AuNPs en los hidrogeles se comparó para composiciones conteniendo cantidades constantes de HRP, laponita y polication, pero para este último modificando las relaciones VBA/VBT,  $n=4, 8$  y  $16$  (**Figura 2.6 A**). Se observó que la mejora en la sensibilidad depende tanto de la cantidad de AuNP como de la densidad de carga positiva del polication. Es por ello, que el mejor rendimiento electroanalítico se obtuvo para el bioelectrodo modificado con el polication con cuatro cargas positivas por unidad copolimérica,  $P^{4+}$  y  $4,50 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos resultados pueden explicarse en términos del equilibrio de fuerzas electrostáticas entre los componentes de hidrogel: laponita, AuNPs, polication y enzima. Dado que el punto isoelectrico de HRP es  $8,9$  (Jia *et al.*, 2002), se puede esperar que la enzima esté cargada positivamente a pH neutro. Por lo tanto, la reducción de las interacciones de repulsión electrostática utilizando el polication menos positivo permitió la mayor incorporación y estabilización de la HRP en la película de hidrogel. El efecto opuesto se observó para los bioelectrodos que contienen GOx ( $pI = 4,2$ ) en el hidrogel de laponita, ya que la sensibilidad aumentó con el incremento de la carga positiva del polication  $P^{4+}$ ,

debido a que dicha enzima se encuentra cargada negativamente a pH neutro (Paz Zanini *et al.*, 2016).

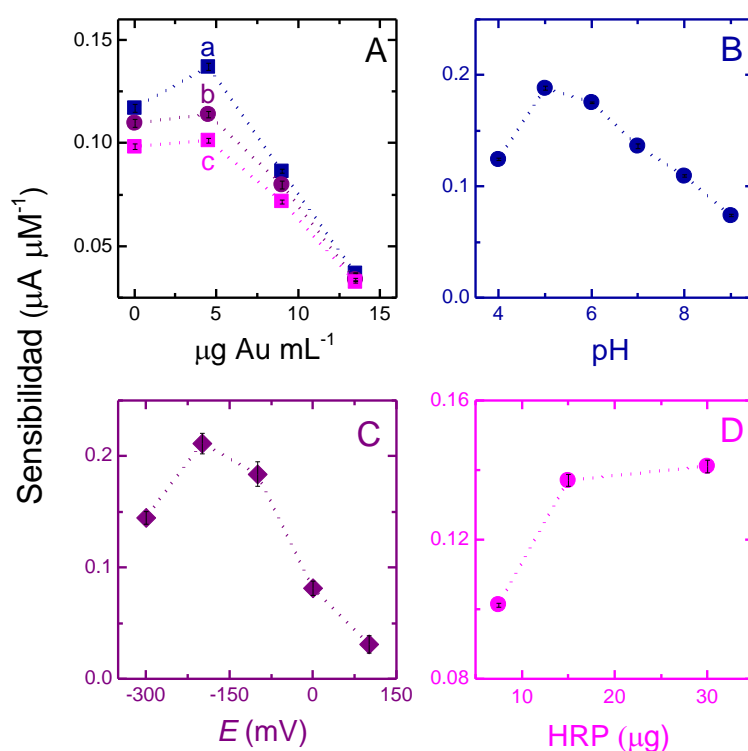
Por otro lado, se conoce que las AuNPs son nanomateriales adecuados para la preparación de bioelectrodos debido a su excelente biocompatibilidad, su gran superficie específica y su conductividad eléctrica (Yeh *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente caso, la incorporación de AuNPs en el hidrogel mejoró ligeramente la sensibilidad utilizando  $4,50 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ , independientemente de la carga positiva del polímero. Teniendo en cuenta que las AuNP están cargadas negativamente (Brewer *et al.*, 2005) así como la laponita (Thompson and Butterworth, 1992), se puede esperar que ambos nanomateriales contribuyan a la neutralización de las cargas positivas portadas por la enzima y las moléculas de polímero. Por lo tanto, cualquier exceso de AuNP puede contribuir a alterar el equilibrio neutro electrostático y la estructura de la película de hidrogel con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

La **Figura 2.6 B** muestra la variación de la sensibilidad del GCE modificado con  $15 \mu\text{g}$  de HRP+ $4,50 \text{ Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ + $30 \mu\text{g}$  de laponita+ $15 \mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$  con el pH de la solución buffer de trabajo, y se observó una variación en forma de campana invertida con el valor más alto para pH 5, como se observa en el caso de la enzima libre (Adediran and Lambeir, 1989). Este comportamiento sugiere que la estructura conformacional del sitio activo de la enzima no se modificó significativamente después de la inmovilización en el hidrogel.

La **Figura 2.6 C** muestra que en condiciones de pH óptimo (pH = 5), los valores más altos de sensibilidad del bioelectrodo se alcanzaron en potenciales entre -200 y -100 mV. Se ha informado que la sensibilidad, la selectividad y la estabilidad operativa del HRP están fuertemente influenciadas por el potencial (Csöregi *et al.*, 1993). A potenciales más negativos la inactivación de la enzima puede ocurrir como resultado de una formación del compuesto altamente oxidado III ( $\text{Fe}^{\text{VI}+}$ ) (Csöregi *et al.*, 1993). Además, también es deseable trabajar a valores de potencial bajos para evitar la interferencia de sustancias fácilmente oxidables que podrían estar presentes en muestras complejas. Los presentes resultados confirman la capacidad del bioelectrodo desarrollado para detectar PPh a potenciales relativamente bajos con una óptima

sensibilidad, mejorando la selectividad de la determinación analítica de PPh en muestras complejas sin la interferencia de otros sustratos.

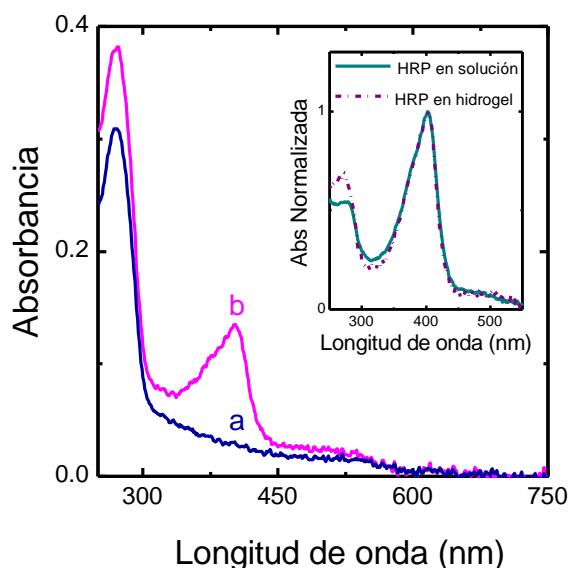
Finalmente, la **Figura 2.6 D** muestra que la sensibilidad del bioelectrodo no cambia por encima de una cantidad de 15  $\mu\text{g}$  de HRP contenida en el hidrogel, lo que indica que esta cantidad de enzima es óptima bajo las condiciones experimentales utilizadas.



**Figura 2.6.** Sensibilidad hacia HQ de los GCEs modificados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M de acuerdo a: **(A)** contenido de Au ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en hidrogeles conteniendo 30  $\mu\text{g}$  de laponita, 15  $\mu\text{g}$  de HRP y 15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{\text{n}+}$  con  $n = \text{a) } 4, \text{ b) } 8$  y **c) 16**; **(B)** pH de la solución buffer; **(C)** potencial aplicado y **(D)** cantidad de HRP incorporada.

Por lo tanto, considerando los resultados anteriores, la mayor sensibilidad se obtuvo para el biosensor compuesto por 15  $\mu\text{g}$  de HRP+4,50  $\text{Au } \mu\text{g mL}^{-1}$ +30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ , el cual será utilizado en los experimentos posteriores.

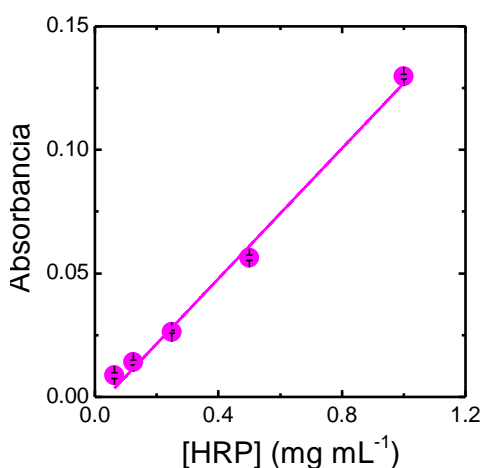
Por otro lado, con el objetivo de corroborar que la enzima inmovilizada en las películas del hidrogel mantiene su actividad biológica, se realizó espectroscopía de absorción UV-Vis. La estabilidad estructural de la HRP puede comprobarse fácilmente mediante esta metodología, debido a la fuerte absorción de la banda Soret alrededor de 400 nm ( $\epsilon \approx 1,03 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) del grupo prostético hemo que posee la enzima, el cual es sensible a las modificaciones conformacionales (Veitch, 2004; Ma, Lu and Xia, 2007). La **Figura 2.7** muestra el espectro del hidrogel conteniendo 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sin HRP (**curva a**), y solo se observó la absorción UV de los residuos del polication vinilbencilo y la banda de absorción visible alrededor de 520 nm debido al plasmón de resonancia superficial de AuNPs, como se mencionó en el Capítulo 1 (Paz Zanini *et al.*, 2017). Por lo tanto, en presencia de la HRP en la película del hidrogel, la fuerte banda de absorción a 403 nm está completamente asociada a la transición de la banda Soret del grupo prostético hemo (**curva b**).



**Figura 2.7.** Espectros UV-Vis de los componentes del hidrogel: 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$  **a)** sin HRP y **b)** con la adición de 15  $\mu\text{g}$  de HRP. **Inserto:** Espectro de absorbancia normalizado de la HRP en buffer (línea sólida) y en el hidrogel (línea punteada) luego de la sustracción de la absorbancia de fondo del hidrogel.

De hecho, el espectro de la HRP obtenido después de restar la contribución de absorbancia de hidrogel fue coincidente con el espectro de la enzima en solución buffer (**recuadro de la Figura 2.7**), confirmando que la estructura secundaria de la enzima no se modificó significativamente por la inmovilización y por lo tanto, conservó su actividad biológica.

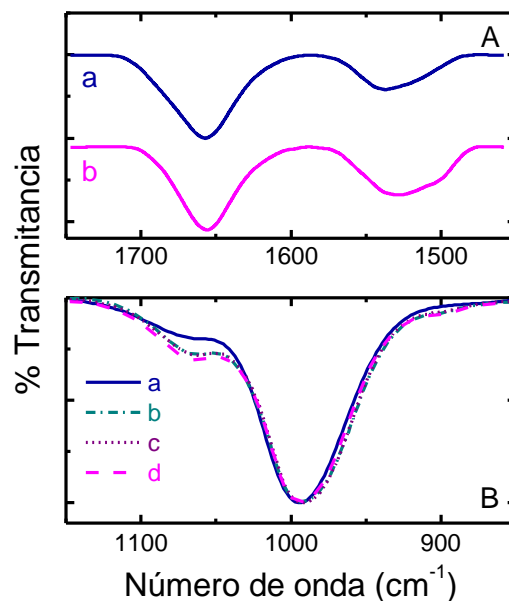
La **Figura 2.8** muestra la curva de calibración para el cambio de absorbancia frente a diferentes concentraciones de HRP ( $0,063\text{--}1\text{ mg mL}^{-1}$ ), obteniéndose un valor de pendiente de  $0,132\pm 0,002\text{ mg mL}^{-1}$  ( $R^2=0,992$ ), el cual sirvió para calcular el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ). De esta manera, con el  $\epsilon$  y con la curva de calibración realizada anteriormente, se estimó el rendimiento de retención de la enzima en la película de hidrogel. La cantidad de HRP inmovilizada en el hidrogel calculada a partir de la curva de calibración UV-Vis fue coincidente ( $14,7\pm 0,3\text{ }\mu\text{g}$ ) con la masa depositada en la preparación de hidrogel ( $15\text{ }\mu\text{g}$ ), confirmando la retención total de la enzima en la película de hidrogel.



**Figura 2.8.** Curva de calibración para la HRP a diferentes concentraciones: 0,063; 0,125; 0,250; 0,500 y 1,000 mg mL<sup>-1</sup>.



La **Figura 2.9 A** muestra los espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR) de la HRP en buffer (**curva a**) y en las películas del hidrogel (**curva b**). No se observaron cambios conformacionales por interacción de la enzima con el nanocompósito, debido a que no hubo modificación en las bandas correspondientes a la amida I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) atribuida a los modos de vibración de estiramiento C=O del enlace peptídico de la proteína, y a la amida II ( $1625-1500\text{ cm}^{-1}$ ) debido a la combinación de flexión N-H y el estiramiento C-N (H. J. A. and I., 2002). Por otro lado, la vibración de la banda de estiramiento Si-O a  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  típica de laponita (Pálková *et al.*, 2010) no tuvo un desplazamiento significativo cuando se añadieron los otros componentes, pero se observó un ligero aumento en la transición después de la adición del polication lo que sugiere un sutil reordenamiento de la estructura de laponita debido a interacciones tanto de enlaces de hidrógeno intermoleculares como electrostáticas (**Figura 2.9 B**).

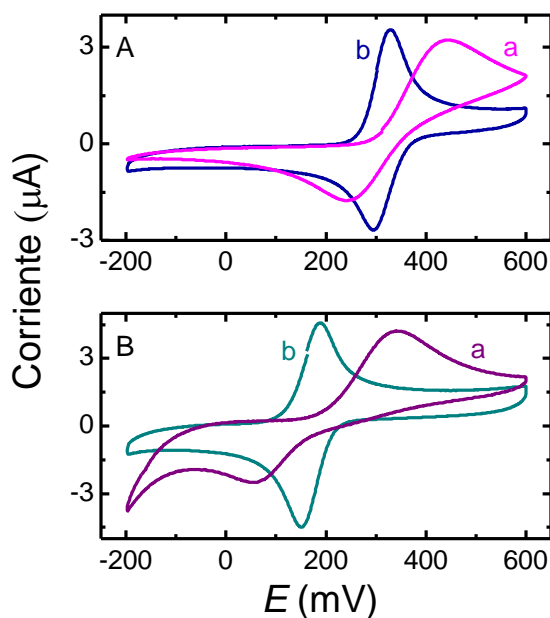


**Figura 2.9. A)** Espectros ATR-FTIR de la HRP en buffer **a**) y en el hidrogel obtenido luego de la sustracción de la absorbancia de fondo del hidrogel **b**). **B)** Espectro ATR-FTIR de **a**) la banda de vibración del estiramiento Si-O de la laponita luego de la incorporación sucesiva de: **b**)  $15\text{ }\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ , **c**)  $4,50\text{ Au }\mu\text{g mL}^{-1}$  y **d**)  $15\text{ }\mu\text{g}$  de HRP.

En resumen, considerando los experimentos anteriores, el biosensor seleccionado mostró una mayor sensibilidad así como un microambiente óptimo, permitiendo conservar la estructura secundaria y la actividad enzimática de la HRP así como la detección de PPh a bajos potenciales (-200 mV).

### 2.3.2. Parámetros analíticos para la detección de hidroquinona y ácido clorogénico

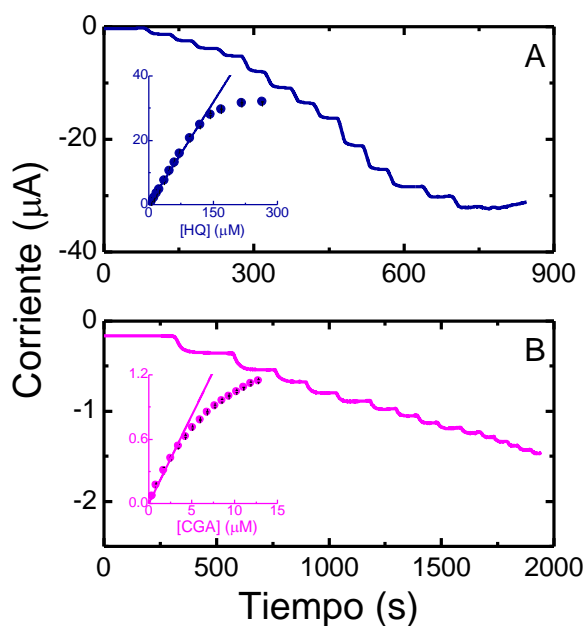
La **Figura 2.10** muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en una celda conteniendo HQ 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 2.10 A**) y CGA 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 2.10 B**) en una solución de buffer fosfato 0,1 M a pH 5 en un rango de potenciales desde -200 a 600 mV a una velocidad de barrido de 30  $\text{mV s}^{-1}$ .



**Figura 2.10.** Voltamperogramas cíclicos de (A) CGA 100  $\mu\text{M}$  , y (B) HQ 100  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 registrados en ausencia  $\text{H}_2\text{O}_2$  con: **a)** GCE limpio y **b)** biosensor seleccionado. Velocidad de barrido: 30  $\text{mV s}^{-1}$ .

Para realizar los experimentos se utilizaron GCEs limpios (**curvas a**) y los GCEs modificados con la composición optimizada del hidrogel (**curvas b**). Se observó que la detección electroquímica directa tanto de HQ como de CGA fue posible sobre ambas superficies. En ambos casos y en ausencia de  $H_2O_2$ , la presencia de la película del hidrogel favorece la reacción de transferencia electrónica de los PPh hacia la superficie del electrodo. La disminución en el potencial de oxidación de ambos PPh (150 mV para HQ y 200 mV para CGA) y la diferencia entre los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) disminuye, indicando que la reacción electroquímica está más favorecida cuando se utilizan los GCEs modificados con la película del hidrogel. Sin embargo, como se demostró anteriormente, en presencia de  $H_2O_2$  los biosensores seleccionados, permiten la detección enzimática tanto de HQ como de CGA a potenciales aún menores (-200 mV).

La **Figura 2.11 A** muestra la señal de corriente en el tiempo y la curva de calibración respectiva para la cuantificación de HQ.



**Figura 2.11.** Cronoamperograma y correspondiente curva de calibración para el biosensor optimizado con  $H_2O_2$  600  $\mu$ M en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para adiciones sucesivas (A) HQ y (B) CGA. Potencial de trabajo: -200 mV.

Para ello se utilizó el biosensor seleccionado en las condiciones experimentales optimizadas, es decir, pH 5, E=-200 mV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 600 μM. Para un conjunto de tres bioelectrodos preparados de manera idéntica, la desviación estándar relativa entre los valores de sensibilidad fue σ=2%, lo que indica la alta reproducibilidad del método de preparación.

La **Tabla 2.2** recoge los valores promedio de los parámetros electroanalíticos obtenidos con un conjunto de tres bioelectrodos preparados de la misma manera comparados con otros bioelectrodos que contienen la HRP inmovilizada. El bioelectrodo desarrollado en este trabajo mostró propiedades analíticas notables, tales como un rango lineal hasta 120 μM, una alta sensibilidad ( $s=218\pm 4 \mu\text{A mM}^{-1}$ ) y un límite de detección muy bajo ( $1,6\pm 0,2 \text{ nM}$ , equivalente a 0,2 ppbv). Este último se calculó como  $3,3 \sigma_b/s$ , donde  $\sigma_b$  es la desviación estándar de la corriente de base y  $s$  es la sensibilidad del bioelectrodo.

**Tabla 2.2.** Propiedades electroanalíticas del biosensor seleccionado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 600 μM en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 para adiciones sucesivas de HQ. Potencial de trabajo: -200 mV.

Composición del electrodo	Sensibilidad (μA mM <sup>-1</sup> )	Rango lineal (μM)	Límite de detección (nM)	Tiempo de respuesta (s)	Ref.
<b>Lap/P<sup>4+</sup>/AuNP/HRP</b>	218 ± 2	Hasta 120	1,6 ± 0,2	27 ± 3	Este trabajo
<b>CNT/PPy/HRP</b>	8	16-240	0,006	2	(Korkut <i>et al.</i> , 2008)
<b>Poly(Arg)/AgNP/SiSG-HRP</b>	420	1-150	570	-	(Raghu <i>et al.</i> , 2013)
<b>Au/MMPs/HRP</b>	8,44	0.5-4.5	400	9	(Elyacoubi <i>et al.</i> , 2006)
<b>GC/PVF/PPy-HRP</b>	15,32	1,6-15	600	-	(Topcu Sulak <i>et al.</i> , 2010)

Lap: laponita; CNT: nanotubos de carbono; PPy: poli(pirrol); SiSG: sol-gel silica; AgNP: nanopartículas de plata; Poly(Arg): poli(arginina); MMPs: micropartículas magnéticas; GC: carbono vítreo; PVF: polivinilferroceno.

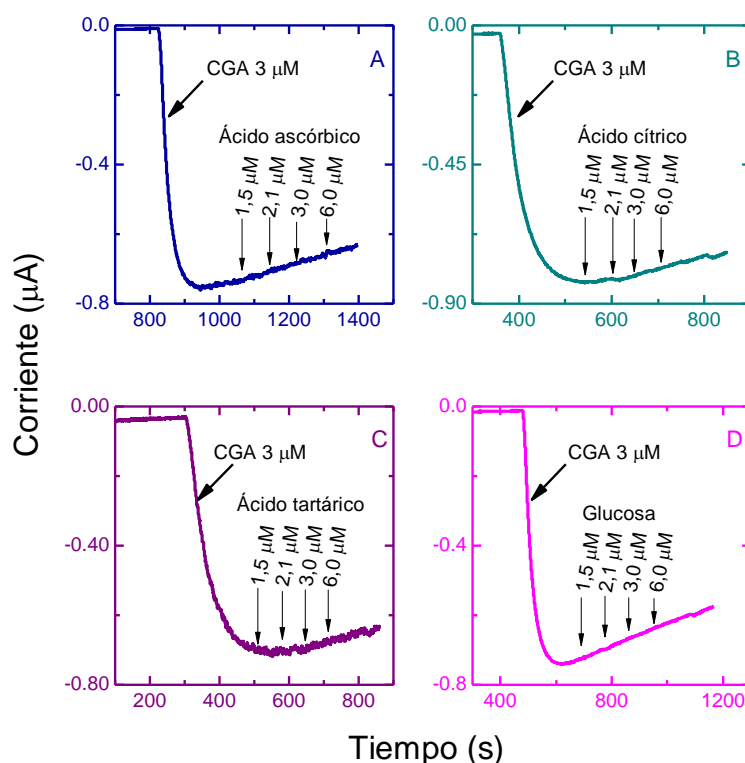
Además, la evaluación de la estabilidad del biosensor indicó que casi el 95% y el 62% de la sensibilidad inicial se conservaron después de 7 y 30 días de almacenamiento en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 a 8 °C, respectivamente. En conjunto, estas características electroanalíticas indican un comportamiento ultrasensible para el presente bioelectrodo hacia la detección de HQ y PPh relacionados.

### **2.3.3. Determinación de la concentración de polifenoles en la yerba mate y el café verde**

Con el objetivo de probar la factibilidad del uso del biosensor desarrollado en muestras reales, se analizó el contenido total de PPh en yerba mate y café verde mediante el método de adición estándar, en este caso utilizando el CGA como solución estándar. Previamente, con el biosensor optimizado se realizó una curva de calibración mediante adiciones sucesivas de CGA 0,85  $\mu\text{M}$  bajo las mismas condiciones experimentales usadas anteriormente (buffer fosfato 0,1 M a pH 5 y -200 mV) para la HQ (**Figura 2.11 B**). Una vez más se observó una detección ultrasensible, con un valor de sensibilidad de  $132 \pm 3 \mu\text{A mM}^{-1}$ , un rango de linealidad de hasta 4,2  $\mu\text{M}$  y un límite de detección de  $2,7 \pm 0,2 \text{ nM}$  (equivalente a 1 ppvb).

La evaluación de las posibles interferencias por otros sustratos típicos presentes en los extractos vegetales se realizó utilizando glucosa, ácido ascórbico, ácido tartárico y ácido cítrico (**Figura 2.12**) (Mello *et al.*, 2003). El efecto de interferencia se evaluó para [interferente]=1,5, 2,1, 3,0 y 6,0  $\mu\text{M}$ , en la celda electroquímica conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 y aplicando un  $E=-200 \text{ mV}$ .

Se observó que los compuestos interferentes probados no modificaron la respuesta electroquímica del biosensor, indicando la selectividad del bioelectrodo hacia los PPh.



**Figura 2.12.** Cronoamperogramas para el biosensor optimizado con  $\text{H}_2\text{O}_2$   $600 \mu\text{M}$  en buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  a pH 5 para una alícuota de CGA  $0,85 \mu\text{M}$  y alícuotas sucesivas de  $1,5$ ,  $2,1$ ,  $3,0$  y  $6,0 \mu\text{M}$  de los diferentes interferentes: ácidos (A) ascórbico, (B) cítrico, (C) tartárico y (D) glucosa.

Por otro lado, los posibles efectos de matriz se evaluaron en términos de recuperación aparente ( $R_A$ ) Ecuación 5.1 (Burns *et al.*, 2002):

$$R_A = \frac{x(\text{obs}, O+S) - x(\text{obs}, O)}{x(S)} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde  $x(\text{obs}, O + S)$  es el valor observado para la muestra enriquecida,  $x(\text{obs}, O)$  el valor observado para la muestra original no enriquecida, y  $x(S)$  el valor del estándar posterior al agregado de la muestra. Se examinaron tres volúmenes diferentes de muestra:  $10$ ,  $20$  y  $30 \mu\text{L}$ . Los respectivos valores de  $\%R_A$  fueron  $92$ ,  $84$  y  $79$  para la yerba mate, y  $91$ ,  $74$  y  $69$  para el café verde. Se observó que para ambas muestras se

obtuvo el mayor %R<sub>A</sub> con el volumen más pequeño, por lo que se procedió a trabajar con 10 µL para realizar la detección de PPh en muestras de alimentos. Por lo tanto, considerando tres réplicas los niveles promedio de polifenoles obtenidos fueron de 1,29±0,04 y 0,037±0,008 mmol g<sup>-1</sup> para la yerba mate y el café verde, respectivamente. Estos resultados no presentan diferencias significativas con los determinados mediante el clásico método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, obteniéndose valores de 1,32±0,04 y 0,042±0,007 mmol g<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 2.4. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se presenta el diseño y desarrollo de un biosensor ultrasensible y estable para la detección de PPh, el cual se preparó en un solo paso y de manera simple. El bioelectrodo se obtuvo por inmovilización de HRP en una película de hidrogel basada en laponita, un polication ADN-bioinspirado y AuNPs. La mejor respuesta amperométrica se obtuvo para el GCE modificado con el polication P<sup>4+</sup> y 4,50 de Au µg mL<sup>-1</sup>, como resultado de un óptimo equilibrio de fuerzas electrostáticas y no electrostáticas, lo que permitió un nanoambiente apropiado para la mantener la actividad enzimática y la conductividad eléctrica en la superficie del electrodo. El electrodo modificado desarrollado posee notables características electroanalíticas en comparación con otros biosensores de HRP para la detección de PPh. Además, el biosensor desarrollado fue capaz de cuantificar el contenido total de PPh en café verde y yerba mate sin ningún efecto de interferencia de las sustancias típicas existentes en estas bebidas, como ser glucosa y ácido ascórbico, tartárico y cítrico. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos con el método de Folin-Ciocalteu, lo que confirma la precisión del bioelectrodo estudiado para la determinación directa de polifenoles en matrices de alimentos.

Finalmente, los resultados presentados demuestran la biocompatibilidad de los polipéptidos de ADN-bioinspirados para la inmovilización de enzimas redox sobre electrodos de carbono en las películas de hidrogel a base de laponita y su potencial aplicación en la determinación de PPh en muestras de alimentos.





# Capítulo 3

---

## Aplicación del biosensor desarrollado en la detección de polifenoles en extractos vegetales sometidos a estrés abiótico

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras frescas poseen un alto contenido de polifenoles (PPh), los cuales son absorbidos y metabolizados por los humanos (Olthof *et al.*, 2001; Olthof *et al.*, 2003; Farah *et al.*, 2008). Estos antioxidantes naturales pueden ser potencialmente aplicables en el tratamiento y/o prevención de algunas enfermedades crónicas y neurodegenerativas (Kanski *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005), incluidos varios tipos de cáncer (Sato *et al.*, 2011), obesidad (Thom, 2007), diabetes (Balasubashini *et al.*, 2004), hepatitis B (Wang *et al.*, 2009), enfermedades cardiovasculares (Olthof *et al.*, 2001), y VIH (Robinson *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1999). Sin embargo, tanto las frutas como las

verduras se encuentran sometidas a todo tipo de estrés desde el momento en que son cosechados hasta que llegan al consumidor. Por ello es necesario recalcar la importancia de los tratamientos poscosecha realizados a los alimentos, ya que cuando se aplica cualquier tipo de estrés abiótico se induce la modificación en el contenido de antioxidantes (Cisneros-Zevallos, 2003).

El incremento de estudios científicos en esta área es crítico para diseñar estrategias que permitan el uso efectivo de cultivos como biofactorías de antioxidantes. Es por ello que en la actualidad el mercado de frutas y verduras mínimamente procesadas frescas (MPF) se encuentra en una creciente demanda y su éxito se debe a la oferta de alimentos altamente nutritivos, convenientes y saludables, manteniendo la frescura que los consumidores esperan (Ragaert *et al.*, 2004). A pesar de ello, en la mayoría de los casos, los tratamientos que se realizan a las frutas y verduras de IV Gama dañan la integridad del tejido, desencadenando procesos de deterioro que incluyen pérdida de agua, ablandamiento del tejido, pardeamiento oxidativo, y desarrollo de olores y sabores no deseados. Esto genera, además, las condiciones ideales para la colonización y proliferación microbiana debido a la eliminación de la barrera epidérmica protectora natural y el aumento de la humedad y los azúcares disueltos en la superficie (Guerzoni *et al.*, 1996). Para ello, la tecnología busca alternativas para la preservación de los alimentos por un mayor periodo de tiempo, involucrando estrategias inteligentes para lograr un resultado específico, diseñado para cada producto MPF (Corbo *et al.*, 2010).

### **3.1.1. Alimentos mínimamente procesados. Efecto de diferentes tipos de cortes**

Uno de los procedimientos utilizados en frutas y verduras de IV Gama para mantener las características mencionadas anteriormente, es cortar los productos en trozos más pequeños. El estrés generado por el corte provoca una herida en el tejido y como consecuencia desencadena una serie de respuestas fisiológicas, incrementando la tasa de respiración (Surjadinata and Cisneros-Zevallos, 2003) y la producción de etileno

(Rolle and Chism, 1987). Cuando se produce el estrés, la célula puede activar señales específicas (Saltveit, 2000; León, Rojo and Sánchez-Serrano, 2001) que regulan el metabolismo para reparar y curar el daño y sintetizar sustancias para evitar la invasión de los depredadores.

En las plantas, muchos compuestos desempeñan un papel en la señalización de heridas. Existen estudios que demostraron que las especies reactivas de oxígeno (EROs) desempeñan un papel clave en la biosíntesis de PPh como respuesta a las heridas (Jacobo-Velázquez *et al.*, 2011). Un estrés o una lesión en una célula vegetal desencadenarán dos tipos de respuestas en el metabolismo de los compuestos polifenólicos. La primera respuesta es la oxidación de los PPh existentes como resultado de la ruptura de la membrana celular, lo que hace que dichos compuestos se combinen con los sistemas de enzimas oxidativas. La otra respuesta implica la síntesis de PPh monoméricos o poliméricos para reparar el daño de heridas. Es por ello, que el aumento en el contenido de PPh es uno de los fenómenos más estudiados como respuesta al estrés provocado por heridas (Toivonen and DeEll, 2002).

### **3.1.2. Zanahorias sometidas a diferentes tipos de cortes**

Las zanahorias (*Daucus carota*) se encuentran entre los tubérculos más populares y se han identificado como las principales fuentes dietéticas de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno (O'Neill *et al.*, 2001). Estos vegetales también contienen cantidades sustanciales de ácido ascórbico (AA) y PPh, siendo el ácido clorogénico (CGA) el compuesto fenólico más abundante identificado en los cultivares de zanahoria (Babic *et al.*, 1993; Kreutzmann *et al.*, 2008).

Existen estudios en los que se informó sobre la acumulación de PPh durante el almacenamiento de zanahorias MPF (Babic *et al.*, 1993; Howard and Griffin, 1993). Además, un aumento en la capacidad antioxidante en zanahorias sometidas a diferentes tipos de corte (trituras y en rodajas) ha sido reportado anteriormente (Cisneros-Zevallos, 2003; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007). Es por ello que el uso de un estrés abiótico controlado, como por ejemplo los diferentes tipos de cortes, se han propuesto como una

herramienta para mejorar el contenido de antioxidantes en las zanahorias al inducir la síntesis/acumulación de PPh (Lafuente *et al.*, 1996; Talcott *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2009). Los palitos y discos de zanahoria, y la zanahoria triturada son los productos más comunes e importantes en el mercado de alimentos MPF. Este procesamiento generalmente implica enjuague inicial, pelado, rebanado, lavado, envasado y almacenamiento (Laurila and Ahvenainen, 2002). Cuando las zanahorias son sometidas a este tipo de estrés, la capa de peridermis se elimina, exponiendo los tejidos internos. La pared celular rota se vuelve susceptible al crecimiento microbiano, los cambios enzimáticos, la fuga de fluido tisular, la deshidratación, etc. (Laurila and Ahvenainen, 2002). Debido a esto, a medida que aumenta la gravedad del estrés aplicado, se produce una mayor decoloración de la superficie y una mayor pérdida en la apariencia visual de las zanahorias (Bolin and Huxsoll, 1991; Barry-Ryan and O'Beirne, 2000).

### **3.1.3. Alimentos mínimamente procesados. Efecto de diferentes intensidades de radiación UV-C**

La radiación UV es una radiación no ionizante con longitudes de onda de 100 a 400 nm, que generalmente se clasifica en tres tipos: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100–280 nm). Existen investigaciones que indican que los niveles elevados de radiación ultravioleta (UV) pueden ser estresantes para las plantas, inducir respuestas morfogénicas (Rozema *et al.*, 1997) y pueden dañar el ADN o los procesos fisiológicos (Paul and Gwynn-Jones, 2003). Sin embargo, las plantas han desarrollado una variedad de mecanismos para proteger y prevenir el daño causado por la radiación. La radiación UV puede actuar como un agente antimicrobiano de forma directa debido al daño del ADN y de forma indirecta debido a la inducción de mecanismos de resistencia contra los patógenos (González-Aguilar *et al.*, 2010). La irradiación UV-C tiene su máximo a 254 nm y es, de las tres, la de mayor acción germicida, y la más utilizada para descontaminar y controlar el crecimiento de microorganismos en alimentos MPF (Vicente *et al.*, 2005).

Varios estudios ya han sido publicados sobre la utilización de radiación UV-C como un método para preservar la calidad de diferentes frutas y verduras de IV Gama (González-Aguilar *et al.*, 2007; Pombo *et al.*, 2009). Además de las características mencionadas anteriormente, la exposición a los rayos UV también induce la síntesis de compuestos que promueven la salud, como los PPh (Cantos *et al.*, 2001). La activación del metabolismo secundario de productos MPF mediante este tratamiento, potencia la síntesis de antioxidantes (Lamikanra *et al.*, 2002; Lamikanra and Richard, 2004).

Es por eso que la aplicación de un tratamiento con radiación UV-C en frutas y verduras de IV Gama podría ofrecer varias ventajas, ya que no deja ningún residuo, no posee restricciones legales, es fácil de usar, es letal para una amplia gama de microorganismos, y no requiere una gran inversión económica y equipos de seguridad costoso para ser implementado (Rivera-Pastrana *et al.*, 2007). Es por ello, que la radiación UV-C puede considerarse una herramienta prometedora para mantener la calidad general de los alimentos MPF y aumentar de esta forma su capacidad antioxidante generando un impacto positivo en la salud.

### **3.1.4. Berenjenas sometidas a diferentes intensidades de radiación UV-C**

La berenjena (*Solanum melongena L.*) es uno de los vegetales con mayor capacidad antioxidante (Cao *et al.*, 1996). Esta propiedades se han atribuido a su alto contenido en PPh (Plazas *et al.*, 2013), dentro de los cuales se encuentra el ácido clorogénico (CGA) presente tanto en la pulpa de la fruta como en la piel. Dado que la mayor parte del volumen de la fruta de la berenjena es la pulpa de la fruta, el CGA es quien aporta una mayor contribución a la calidad funcional de la berenjena (Nisha *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, los PPh presentan muchas propiedades benéficas para la salud humana como ser los efectos antioxidantes, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, neuroprotectores y cardioprotectores (Plazas *et al.*, 2013).

Existen estudios en los que se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes intensidades de radiación UV-C con el objetivo de incrementar el contenido de PPh de las frutas de berenjena, aprovechando las ventajas mencionadas de dicho tratamiento (Plazas *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en el presente capítulo se evalúa la aplicación del biosensor desarrollado en la detección del contenido de PPh en zanahorias y berenjenas sometidas a estrés abiótico como ser diferentes tipos de cortes y diferentes intensidades de radiación UV-C, respectivamente.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Preparación de muestras**

Las zanahorias (*Daucus carota*) y las berenjenas moradas (*Solanum melongena* L.) (**Figura 3.1**) fueron adquiridas en un mercado local. Luego de eliminar los frutos que contenían defectos y seleccionar aquellos con tamaño similar, se procedió a lavarlos mediante inmersión durante 5 minutos en agua conteniendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de NaClO (pH 6,5). En el caso de las zanahorias, se realizaron dos tipos de cortes: rodajas (aproximadamente  $5 \times 30 \text{ mm}^2$ ) y ralladas (aproximadamente  $1 \times 20 \text{ mm}^2$ ), mientras que una muestra sin tratamiento se utilizó como la muestra control. En el caso de las berenjenas, se cortaron láminas de tamaño aproximado  $1 \times 15 \text{ cm}^2$ , y se irradiaron ambas caras a dos intensidades de radiación UV-C ( $1$  y  $10 \text{ kJ/m}^2$ ), mientras que la muestra control no fue irradiada. Para ello, se dispuso de un equipo formado por un recipiente de acero inoxidable de  $1,70 \times 1,00 \times 0,10 \text{ m}$ , con 8 lámparas germicidas, sin filtros, ubicadas en la parte superior del equipo. Posteriormente, se envasaron las zanahorias (100 g) y las berenjenas (3 láminas) en bandejas de polipropileno ( $17,4 \text{ cm} \times 13,8 \text{ cm} \times 4,8 \text{ cm}$ , Cellpack SA, Santa Fé, Argentina), y se recubrieron con polipropileno de  $35 \text{ }\mu\text{m}$  (tasa de transmisión de  $\text{O}_2$  de  $5,000 \text{ mL O}_2/\text{m}^2/24 \text{ h/atm}$ , de  $\text{CO}_2$  de  $18,000 \text{ mL CO}_2/\text{m}^2/24\text{h/atm}$  y de vapor de agua de  $110 \text{ g/m}^2/24 \text{ h/atm}$ ) y se almacenaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 6 días. Las muestras se procesaron o se almacenaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso, según la necesidad del ensayo.

La preparación de los extractos vegetales para las determinaciones electroquímicas se llevó a cabo mediante la homogeneización de 5 y 2 g con 20 y 10 mL de etanol para las zanahorias y para las berenjenas, respectivamente. Luego, los extractos fueron sonicados durante 10 minutos, filtrados (Whatman® Grade 589/2), centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos y almacenados en heladera a 4 °C hasta su uso. Para las determinaciones espectrofotométricas la preparación de los extractos se llevó a cabo mediante la homogeneización de 5 y 1 g con 20 mL de etanol y metanol para las zanahorias y para las berenjenas, respectivamente. Luego, los extractos fueron sonicados durante 10 minutos, filtrados (Whatman® Grade 589/2), centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos y almacenados en heladera a 4 °C hasta su uso.



**Figura 3.1.** Vegetales utilizados para determinar el contenido de polifenoles.

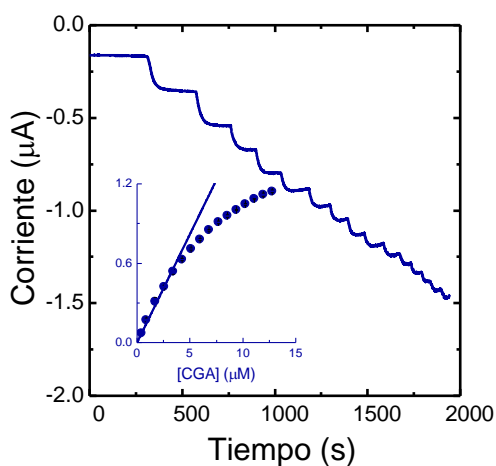
Para las medidas electroquímicas se utilizó el biosensor diseñado y desarrollado en el Capítulo 2 (GCE con 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ +15  $\mu\text{g}$  de HRP), y la detección de PPh se llevó a cabo empleando 20 y 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de los extractos de zanahoria y berenjena, respectivamente, y las concentraciones se determinaron mediante el método de adición estándar. En el caso de las medidas

espectrofotométricas se utilizó el clásico método de Folin-Ciocalteu, y la detección de PPh se llevó a cabo utilizando 350  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de los extractos de zanahoria y berenjena, y las concentraciones se determinaron mediante la respectiva curva de calibración.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Detección de polifenoles en extractos vegetales sometidos a estrés

La **Figura 3.2** muestra la respuesta de la corriente estacionaria en función del tiempo para el GCE modificado con 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 de Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ +15  $\mu\text{g}$  de HRP.



**Figura 3.2.** Cronoamperograma y curva de calibración para biosensor seleccionado (GCE modificado con 30  $\mu\text{g}$  de laponita+15  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}^{4+}$ +4,50 Au  $\mu\text{g mL}^{-1}$ +15  $\mu\text{g}$  de HRP) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M aS pH 5 para adiciones sucesivas CGA 0,85  $\mu\text{M}$ . Potencial de trabajo: -200 mV.

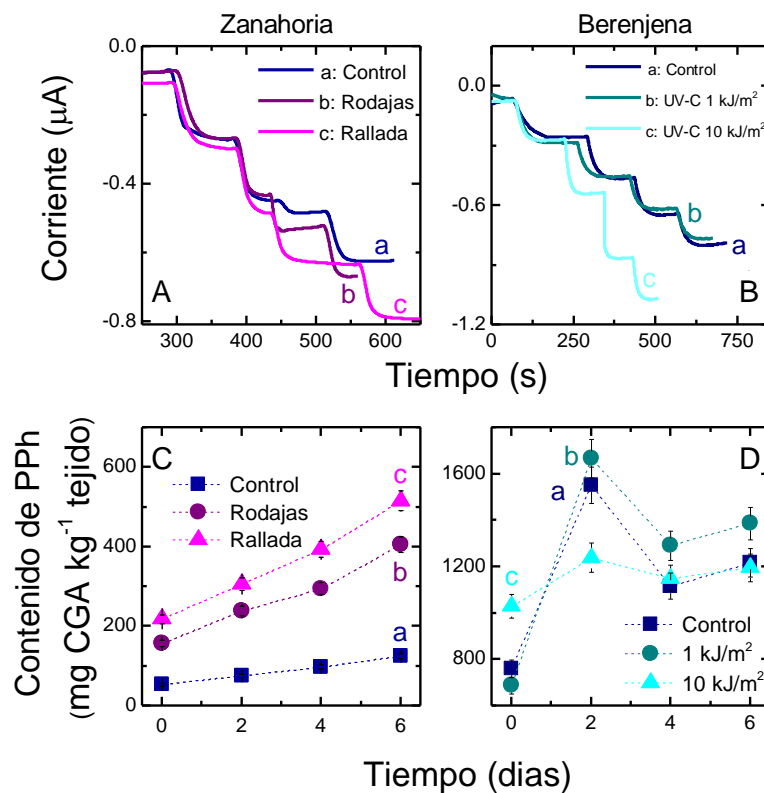


La curva de calibración (**inserto Figura 3.2**) se llevó a cabo midiendo las corrientes estacionarias obtenidas mediante adiciones sucesivas de CGA 0,85  $\mu\text{M}$  en una celda electroquímica conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 y un potencial de trabajo de -200mV. Como se describió en el Capítulo 2, el biosensor exhibió excelentes parámetros analíticos obteniéndose una sensibilidad de  $132 \pm 3 \mu\text{A mM}^{-1}$ , un rango de linealidad de hasta 4,2  $\mu\text{M}$  y un límite de detección de  $2,7 \pm 0,2 \text{ nM}$  (equivalente a 1 ppb).

Para realizar la detección de PPh utilizando el biosensor seleccionado, se procedió al agregado sucesivo de dos alícuotas de CGA 0,85  $\mu\text{M}$ , con el objetivo de verificar que el aumento de la corriente sea proporcional a la concentración del estándar y asegurar que las mediciones realizadas se encuentren en la región lineal de la curva de calibración. Luego, se añadió una alícuota de 20 o 10  $\mu\text{L}$  de los extractos de zanahorias o de berenjenas, respectivamente. Por último, se agregó nuevamente una alícuota de CGA 0,85  $\mu\text{M}$  para determinar el porcentaje de recuperación aparente ( $\%R_A$ ) de la señal del bioelectrodo, y determinar si algunos de los componentes presentes en la muestra interfieren en la respuesta del biosensor ya sea, aumentando o disminuyendo la señal de corriente.

Las **Figuras 3.3 A y B** muestra los perfiles de la corriente en función del tiempo para los extractos de zanahoria y berenjena en el día 0, respectivamente. Para el caso de las zanahorias (**Figura 3.3 A**), se observó que a medida que aumenta la gravedad del estrés aplicado, aumenta el contenido de PPh. Es por eso que el contenido de antioxidantes es mayor en el caso de las muestras ralladas (**curva c**), seguido de las muestras cortadas en rodajas (**curva b**) y, en ambos casos, el contenido es mayor al observado en las muestras control que no fueron sometidas a estrés (**curva a**). En el caso de las berenjenas (**Figura 3.3 B**), se observó que para las muestras sometidas a una intensidad de 1  $\text{kJ/m}^2$  de radiación UV-C (**curva b**) no se encuentran diferencias significativas con respecto a las muestras control (**curva a**) en cuanto al contenido de PPh. Mientras que para las muestras a las que se le aplicó una intensidad de 10  $\text{kJ/m}^2$  de radiación UV-C (**curva c**) muestran un mayor contenido de PPh en comparación a las muestras control y a las muestras sometidas a 1  $\text{kJ/m}^2$ .

Las **Figuras 3.3 C y D** muestran el contenido de PPh obtenidos para todas las muestras de zanahorias y berenjenas sometidas a estrés, respectivamente, durante todo el período de almacenamiento. Se observó para el caso de las zanahorias (**Figura 3.3 C**) que, independientemente del tipo de corte aplicado, el contenido de PPh incrementa a medida que transcurren los días de almacenamiento. Sin embargo, este incremento es más notorio en las muestras que fueron sometidas a un estrés más severo, es decir a las zanahorias ralladas (**curva c**). Esto sugiere que, a pesar del tipo de corte aplicado, el metabolismo y el sistema de defensa de estos vegetales en las condiciones experimentales utilizadas tiene como consecuencia un aumento en el contenido de PPh generando un impacto benéfico al aplicarse un procesamiento mínimo bajo estas condiciones (Surjadinata and Cisneros-Zevallos, 2012).



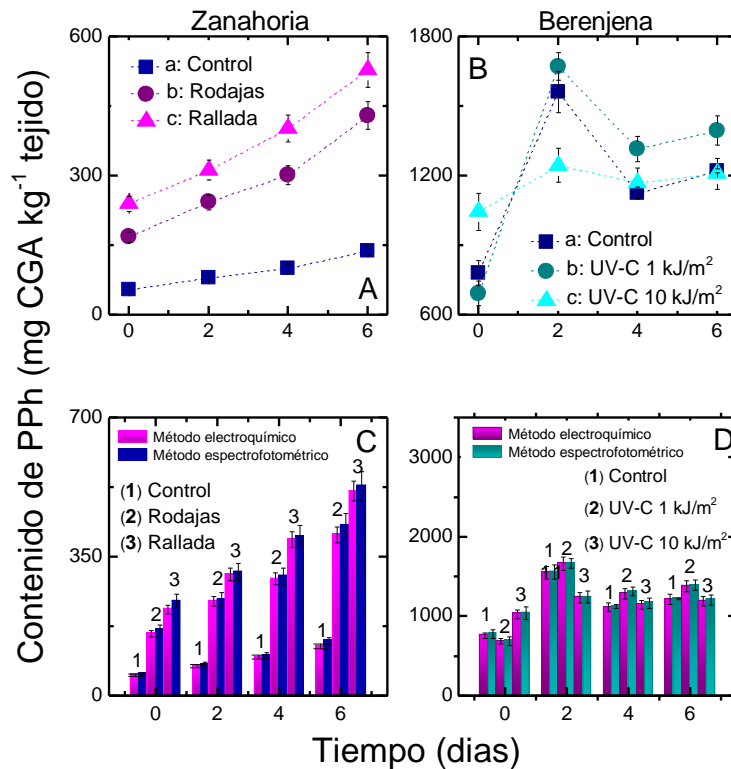
**Figura 3.3.** Cronoamperogramas para biosensor seleccionado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  600  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 5 en extractos de (A) zanahorias y (B) berenjenas. Potencial de trabajo: -200 mV. Contenido de polifenoles a lo largo del período de almacenamiento para muestras de (C) zanahorias y (D) berenjenas.

Para el caso de las berenjenas (**Figura 3.3 D**) se observó que, independientemente de la intensidad de radiación aplicada, el contenido de PPh incrementa hasta el día 2 y luego comienza a disminuir a medida que transcurren los días de almacenamiento. Para el caso de las muestras control (**curva a**) y las muestras sometidas a una intensidad de radiación de  $1 \text{ kJ/m}^2$  (**curva b**), no existen diferencias significativas en el contenido de PPh hasta el día 2, y ambas poseen una mayor cantidad de antioxidantes en comparación a las muestras sometidas a una intensidad de radiación de  $10 \text{ kJ/m}^2$ . Sin embargo, a medida que transcurre el período de almacenamiento, las muestras sometidas a una intensidad de radiación de  $1 \text{ kJ/m}^2$  poseen un mayor contenido de PPh. Por lo tanto, se podría decir que una intensidad de radiación UV-C de  $1 \text{ kJ/m}^2$  provoca un efecto benéfico sobre las berenjenas, permitiendo aumentar el contenido de PPh y conservando las propiedades nutricionales y sensoriales de estos alimentos.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos con el biosensor desarrollado, se realizó la determinación espectrofotométrica de los extractos de zanahorias y berenjenas durante todo el período de almacenamiento (**Figuras 3.4 A y B**). Los datos obtenidos<sup>2</sup> mediante el método Folin-Ciocalteu fueron similares a los obtenidos en las determinaciones electroquímicas, no encontrándose diferencias significativas (**Figuras 3.4 C y D**).

---

<sup>1</sup>Estos datos fueron obtenidos a través de una colaboración con el grupo de trabajo dirigido por la Dra. Silvia del C. Rodríguez en Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL), CONICET-UNSE. En particular, los experimentos fueron realizados por la Ing. Laura Lemos, en el marco del desarrollo de su tesis doctoral. Agradecemos el enorme aporte y colaboración.



**Figura 3.4.** Contenido de PPh a lo largo del período de almacenamiento obtenido mediante el método espectrofotométrico en (A) zanahorias y (B) berenjenas. Comparación de ambos métodos en (C) zanahorias y (D) berenjenas.

En la **Tabla 3.1** se muestra el contenido de PPh obtenido mediante ambas metodologías. Se considera que las diferencias entre los dos conjuntos de experimentos no son estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95%. Sin embargo, en todos los casos, los valores del contenido de PPh en las muestras de los extractos vegetales determinados mediante técnicas electroquímicas fueron menores comparadas con el método espectrofotométrico. Esto se debe, a que la reacción de Folin-Ciocalteu se produce una reacción redox en la que se pueden oxidar otros compuestos de la muestra además de los PPh. Por el contrario, el biosensor utilizado es mucho más selectivo y específico debido a la reacción generada por la HRP inmovilizada en la película del hidrogel.

**Tabla 3.1.** Contenido de polifenoles expresados en mg CGA 1000 g<sup>-1</sup> tejido en extractos vegetales sometidos a estrés comparando los métodos electroquímico y espectrofotométrico.

Dia	Zanahorias control		Zanahorias en rodajas		Zanahorias ralladas	
	Biosensor	Folin-Ciocalteu	Biosensor	Folin-Ciocalteu	Biosensor	Folin-Ciocalteu
<b>0</b>	53 ± 3	55 ± 4	157 ± 8	168 ± 12	218 ± 11	240 ± 17
<b>2</b>	75 ± 4	80 ± 5	239 ± 12	243 ± 17	306 ± 15	313 ± 22
<b>4</b>	98 ± 5	101 ± 7	295 ± 15	302 ± 21	393 ± 19	402 ± 25
<b>6</b>	125 ± 6	138 ± 9	406 ± 20	430 ± 25	516 ± 22	528 ± 30
Dia	Berenjenas control		Berenjenas UV-C 1 kJ		Berenjenas UV-C 10 kJ	
	Biosensor	Folin-Ciocalteu	Biosensor	Folin-Ciocalteu	Biosensor	Folin-Ciocalteu
<b>0</b>	761 ± 38	782 ± 53	687 ± 34	692 ± 53	1030 ± 52	1046 ± 80
<b>2</b>	1551 ± 78	1561 ± 88	1666 ± 83	1672 ± 59	1239 ± 62	1246 ± 73
<b>4</b>	1116 ± 56	1126 ± 26	1290 ± 64	1316 ± 56	1150 ± 58	1170 ± 66
<b>6</b>	1218 ± 61	1222 ± 78	1386 ± 69	1209 ± 63	1196 ± 60	1210 ± 66

### 3.4. CONCLUSIONES

El biosensor desarrollado pudo ser utilizado para evaluar el cambio en el contenido de PPh en extractos de zanahorias y berenjenas sometidos a los diferentes tipos de estrés, y los resultados fueron comparables a los obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, el bioelectrodo exhibe ventajas con respecto al método espectrofotométrico, como ser un menor consumo de tiempo, una mayor sensibilidad, un menor límite de detección, poder trabajar con volúmenes muy pequeños de muestra y una mayor especificidad y selectividad.

Por otro lado, se verificó que el contenido de PPh existentes y los provocados por el estrés aplicado en tejidos de zanahorias dependían de la intensidad de los cortes (Jacobó-Velázquez *et al.*, 2011). La concentración de PPh se incrementó, en comparación con el tratamiento control, a medida que el estrés aplicado fue más intenso. En el caso de las berenjenas, la exposición a una intensidad de radiación UV-C de 1 kJ/m<sup>2</sup> produce una estimulación la cual se ve reflejada en un incremento en el

contenido de los PPh, aunque se observó que dicho aumento es dependiente del tiempo de almacenamiento de vegetales.

Los resultados obtenidos se corresponden con los esperados en relación a la intensidad del corte o de la intensidad de radiación UV-C aplicada, herramientas simples para proporcionar una fuente económica de antioxidantes fenólicos en vegetales mínimamente procesadas así como para obtener alimentos con un alto valor nutritivo.



# Capítulo 4

---

## Diseño y desarrollo de un sensor para la detección de ácido ascórbico

### 4.1. INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico es un compuesto redox abundante y soluble en agua (Smirnoff, 2018). Este compuesto es una vitamina biológicamente importante debido a que participa en el metabolismo humano y está presente en el cerebro de los mamíferos junto con varias aminas neurotransmisoras. El ácido ascórbico se encuentra en frutas, verduras, bebidas y medicamentos (Umasankar *et al.*, 2007) y su ingesta es de suma importancia no solo por su función en la prevención del estrés oxidativo actuando como agente reductor de los metales iónicos (por ejemplo,  $\text{Fe}^{3+}$ ) y en la eliminación de radicales libres, sino también por su participación en la división celular y como un cofactor en una variedad de reacciones enzimáticas (Smirnoff, 2018). Es por ello que se han desarrollado muchos métodos para su determinación (Umasankar *et al.*, 2007). Entre estos métodos, como se mencionó en el Capítulo 1, las técnicas electroanalíticas son algo más ventajosas que otras, tales como las cromatográficas,



espectrofotométricas, etc. (Bajaj and Kaur, 1981; Sakakibara *et al.*, 2003; Pisoschi *et al.*, 2009; Šeruga *et al.*, 2011). En este sentido, la determinación electroanalítica de ácido ascórbico utilizando nanomateriales recibe una gran atención debido a múltiples ventajas como la selectividad, la sensibilidad y el manejo sencillo de la muestra (Hayat *et al.*, 2014; Jadon *et al.*, 2016). Entre la diversidad de materiales empleados para la preparación de nanocompuestos, la combinación de los nanotubos de carbono, las nanopartículas metálicas y los polímeros para la modificación de las superficies de los electrodos mejoran en gran medida la respuesta electroanalítica de muchas moléculas de importancia tanto biológica como farmacéutica (Dey *et al.*, 2013; Hayat *et al.*, 2014; Jadon *et al.*, 2016). Esto se debe a las excelentes propiedades de los diferentes nanomateriales, las cuales fueron descritas en el Capítulo 1.

En el presente capítulo se presenta el diseño y desarrollo de un sensor para la determinación de ácido ascórbico y su potencial aplicación en muestras de alimentos. Para su preparación se utilizó un electrodo de carbono vítreo modificado con un nanocompuesto preparado con nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados, nanopartículas de oro recubiertas con cloruro de poli(dialildimetilamonio) y cloruro de poli(vinilbencilamonio). El sensor fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas y electroquímicas. Además, el rendimiento analítico del sensor electroquímico para la detección de ácido ascórbico se caracterizó con soluciones estándar conteniendo interferentes típicos.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Materiales**

Los nanotubos de carbono de pared múltiple (diámetro externo  $30\pm 15$  nm, longitud 1-5  $\mu\text{m}$ ) fueron adquiridos de NanoLabInc. El tetracloro-aurato y el cloruro de poli(dialildimetilamonio) (PDDA) al 20% p/v se obtuvieron de Sigma Aldrich, y el ácido ascórbico de Anedra. La glucosa, el paracetamol y las sales de buffer de fosfato de sodio para análisis, se adquirieron de J.T. Baker (Mexico); mientras que el hidróxido de sodio, el ácido sulfúrico y nítrico se obtuvieron de Biopack (Argentina). Los

polímeros ADN-bioinspirados fueron obtenidos de un trabajo en colaboración<sup>3</sup>; donde la copolimerización de vinilbenciltimina (VBT) y vinilfenilsulfonato (VPS),  $\{[(VBT)(VPS)_{16}]^{16-}\}_{\approx 25}$  (nombrado como P<sup>16-</sup>) y el policationo cloruro de polivinilbencilamonio (pVBA) se llevó a cabo en un reactor bajo una atmósfera de nitrógeno de acuerdo al método utilizado por Warner y Dahman (Dahman *et al.*, 2003; Bianchini *et al.*, 2007). Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua tridestilada y los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

## 4.2.2. Medidas electroquímicas

Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo de igual manera a la que se describió en el Capítulo 2. En este caso, se utilizaron como electrodos de trabajo GCEs modificados. Las soluciones de buffer fosfato 0,1 M, a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8 y 10), fueron utilizadas como electrolito soporte; mientras que la temperatura de trabajo fue de 25 °C.

Los voltamperogramas cíclicos se registraron entre -400 y 400 mV, a diferentes velocidades de barrido. Los estudios de cronoamperometría se realizaron con agitación magnética al potencial de trabajo de 50 mV. La señal de la corriente se registró en función del tiempo después de la adición de alícuotas sucesivas de ácido ascórbico (AH<sub>2</sub>). Las mediciones de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se llevaron a cabo utilizando una solución de una cupla rédox de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mM+K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mM preparada en KCl 0,1 M. La respuesta de impedancia en función de la frecuencia de perturbación se obtuvo aplicando un potencial con una amplitud de ± 5 mV a ± 10 mV, manteniendo así la condición de estado estacionario del sistema. Dicha perturbación fue aplicada en forma superpuesta con un potencial constante de polarización de 200 mV en un rango de frecuencias de 0,05 Hz - 10 kHz.

---

<sup>3</sup>Estos polímeros fueron obtenidos a través de una colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Débora Martino. Agradecemos el enorme aporte y colaboración.

### 4.2.3. Preparación de nanopartículas de oro recubiertas con polielectrolitos

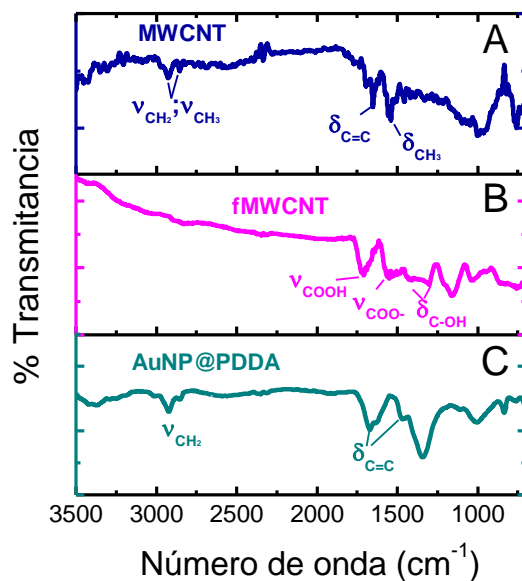
Las nanopartículas de oro coloidal (AuNPs) recubiertas con cloruro de poli(dialildimetilamonio), PDDA, (AuNP@PDDA) se prepararon mediante reducción térmica de una solución básica de  $\text{HAuCl}_4$  de acuerdo al método utilizado por Chen (Chen *et al.*, 2006). Un procedimiento idéntico se realizó para la preparación de las AuNPs cubiertas con cloruro de polivinilbencilamonio, pVBA, (AuNP@pVBA) utilizando una solución de pVBA de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 4.2.4. Preparación de los nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados

Para funcionalizar los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), se realizó una reacción oxidativa con una mezcla de ácidos sulfúrico y nítrico concentrados para generar grupos carboxílicos (COOH) sobre la superficie externa de los nanotubos, de acuerdo a lo mencionado por Kim (Kim *et al.*, 2012). Posteriormente, con el objetivo de corroborar la presencia de residuos de COOH en los nanotubos de pared múltiple funcionalizados (fMWCNT), se realizó espectroscopía ATR-FTIR.

La **Figura 4.1** muestra los espectros obtenidos para los nanotubos de carbono sin funcionalizar (MWCNT) y funcionalizados (fMWCNT). Para el caso de los MWCNT (**Figura 4.1 A**), las bandas fijas a  $2920 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2852 \text{ cm}^{-1}$  y  $3005 \text{ cm}^{-1}$  se asignaron tanto a la vibración de estiramiento asimétrica como simétrica de  $\text{CH}_2$  y al estiramiento asimétrico de  $\text{CH}_3$ . La banda a  $1649 \text{ cm}^{-1}$  se asignó a la vibración de flexión de  $\text{C}=\text{C}$ , mientras que la vibración asimétrica de flexión de  $\text{CH}_3$  es de  $1469 \text{ cm}^{-1}$  (Jiang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005). Por su parte, los fMWCNT (**Figura 4.1 B**) mostraron una fuerte señal a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de estiramiento de COOH y de  $\text{COO}^-$  a  $1570 \text{ cm}^{-1}$ , junto con nuevas bandas a  $1419 \text{ cm}^{-1}$  y  $1296 \text{ cm}^{-1}$  que indicaron las vibraciones de flexión y estiramiento de C-OH, respectivamente, (Chen *et al.*, 1998;

Luo *et al.*, 2001). Por lo tanto, considerando los resultados anteriores, se observa que se logró la modificación efectiva de los MWCNT después del procedimiento de oxidación ácida.



**Figura 4.1.** Espectros ATR-FTIR de los nanotubos de pared múltiple (A) antes (MWCNT) y (B) después del tratamiento ácido de oxidación (fMWCNT). (C) Espectro de las AuNPs recubiertas con PPDA (AuNP@PDDA).

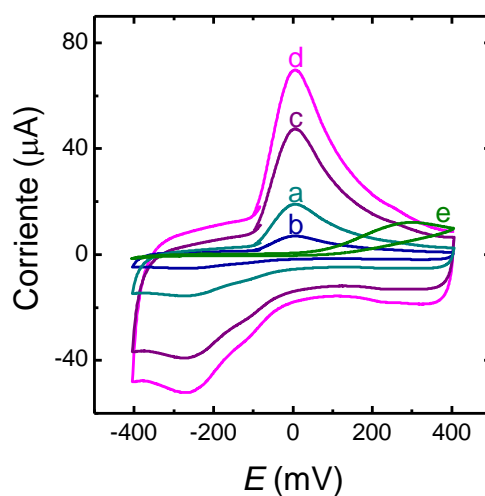
#### 4.2.5. Preparación del sensor

Para preparar las superficies (0,07 cm<sup>2</sup>) de los GCEs, las mismas fueron tratadas como se describió en el Capítulo 2. Sobre estas superficies se depositaron 30 μL de una suspensión acuosa que contenía sólo los fMWCNT o mezclas de cada tipo de nanotubos estabilizados con AuNP@PDDA o AuNP@pVBA y se dejaron secar a 25°C. Por último, se prepararon tres electrodos más agregando 30 μL de una solución de P<sup>16-</sup> (2 mg mL<sup>-1</sup>) a la superficie de GCE conteniendo los fMWCNT con cada tipo de AuNPs. Después de 30 minutos de deposición, la solución de polielectrolito se lavó con agua destilada y la superficie del electrodo se secó al aire.

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1. Efecto de la composición de la película de hidrogel en el análisis de ácido ascórbico

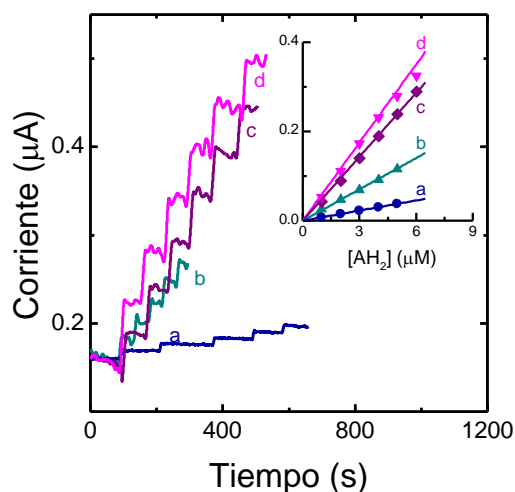
La **Figura 4.2** muestra los voltamperogramas cíclicos de los GCEs modificados con a) MWCNT+AuNP@PDDA, b) MWCNT+AuNP@pVBA, c) fMWCNT+AuNP@pVBA, d) fMWCNT+AuNP@PDDA y e) limpio para la oxidación de AH<sub>2</sub> en una solución de buffer fosfato 0,1 M a pH 7 utilizando una velocidad de barrido de 30 mV s<sup>-1</sup>. En el electrodo sin modificar (**curva e**) se observó la oxidación del analito a un valor de potencial anódico  $E_{pa} \sim 300$  mV, mientras que para todos los demás electrodos modificados, dicho proceso se observó a  $E_{pa} \sim 5-10$  mV.



**Figura 4.2.** Voltamperogramas cíclicos registrados en AH<sub>2</sub> 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 a una velocidad de barrido de 30 mV s<sup>-1</sup> obtenidos sobre los GCEs modificados con: **a)** MWCNT/AuNP@PDDA, **b)** MWCNT/AuNP@pVBA, **c)** fMWCNT/AuNP@pVBA, **d)** fMWCNT/AuNP@PDDA y, **e)** limpio.

La **Figura 4.3** muestra las respuestas de corriente en función del tiempo para los diferentes GCE modificados y las gráficas de calibración respectivas se muestran en el inserto de la figura. Para estos experimentos se utilizó un potencial de trabajo de 50 mV, debido a que a este valor de potencial se produce la oxidación completa del analito en la superficie del electrodo. El ajuste de las respectivas curvas de calibración arrojó una respuesta lineal ( $R^2=0,998$ ) hasta que la concentración de  $AH_2 < 7 \mu M$  para todos los electrodos estudiados. El valor de pendiente inicial de estas gráficas representa la sensibilidad del electrodo ( $[=] \text{nA } \mu M^{-1}$ ) hacia  $AH_2$ , y se puede observar una gran dependencia con la composición de la película de los nanocompuestos. Los parámetros analíticos se calcularon como se mencionó en el Capítulo 2.

El incremento de sensibilidad observado puede explicarse por la modificación de la superficie electroactiva con los diferentes nanomateriales. Los GCE conteniendo los fMWCNT (**curvas c y d**) mostraron valores de sensibilidad mayores que aquellos que contenían los MWCNT (**curvas a y b**).



**Figura 4.3.** Cronoamperogramas obtenidos a 50 mV para adiciones sucesivas de  $AH_2$  1  $\mu M$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 con el GCE modificado con: **a)** MWCNT/AuNP@PDDA; **b)** MWCNT/AuNP@pVBA; **c)** fMWCNT/AuNP@pVBA; y **d)** fMWCNT/AuNP@PDDA. **Inserto:** Curvas de calibración.

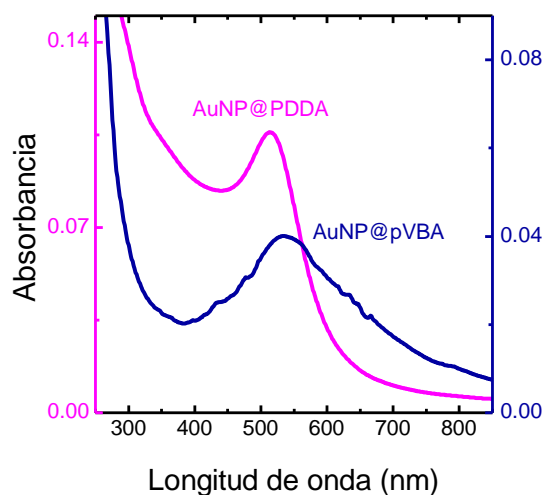
A pH neutro, el anión ascorbato ( $AH^-$ ) es la especie presente en mayor concentración debido a que el  $pK_{a1}=4,2$  (Dryhurst *et al.*, 1982), y se esperaría una mayor interacción con la superficie del electrodo modificado con las AuNPs cargadas positivamente. Por otro lado, esta interacción electrostática también se esperaría entre las AuNPs y los fMWCNT conteniendo grupos  $-COO^-$  en su superficie. En el caso de los GCEs modificados con los MWCNT, se observó una menor sensibilidad, esto podría deberse a que al no poseer una carga neta superficial, la adsorción de las AuNP cargadas positivamente es menor.

Por otro lado, para el sensor GCE/MWCNT+AuNP@pVBA (**curva b**) se observó una sensibilidad tres veces mayor que para el sensor GCE/MWCNT+AuNP@PDDA (**curva a**), sugiriendo que las interacciones  $\pi-\pi$  entre las fracciones bencílicas aromáticas del pVBA y los MWCNT son la fuerza motriz principal para la unión de las AuNPs. Es por ello, que se esperaría una adsorción más débil de las AuNP@PDDA en los MWCNT, debido a las interacciones  $\pi-\pi$  inducidas por trazas de contaminantes de enlaces  $C=C$  que se produjeron en el esqueleto de polimerización durante la reducción de  $HAuCl_4$  por PDDA (Chen *et al.*, 2006). En el presente caso, el espectro de las AuNP@PDDA (**Figura 4.1 C**) muestra la vibración de estiramiento de  $CH_2$  a  $2750\text{ cm}^{-1}$  y las típicas vibraciones de flexión  $C=C$  a  $1635\text{ cm}^{-1}$  y  $1476\text{ cm}^{-1}$  (Yang *et al.*, 2005; Hayat *et al.*, 2014). Se espera que la formación de  $C=C$  y  $C=N$  ocurra después de la reducción de  $HAuCl_4$  por PDDA (Smirnoff, 2018).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA mostró una mejor respuesta para la detección de  $AH_2$ . Sin embargo, su gráfica de calibración se desvía de la linealidad a altas concentraciones de  $AH_2$  (**inserto Figura 4.3, curva d**), lo que sugiere un efecto de saturación de la respuesta del sensor por parte del analito.

En la **Figura 4.4** se muestran los espectros UV-Vis tanto de las AuNP@PDDA como de las AuNP@pVBA. Se observó en ambos casos una banda de SPR intensa alrededor de 500-550 nm, típica para las AuNPs cilíndricas, y la ausencia de una banda por encima de 600 nm (Link and El-sayed, 2000a), sugiriendo que las nanopartículas son esféricas. Para este tipo de AuNPs, se produce un desplazamiento al rojo de  $\lambda_{max}$  a

medida que aumenta el diámetro de las mismas (Link and El-sayed, 2000a). Se obtuvo una banda SPR más azul ( $\lambda_{\max}=515$  nm) y más estrecha para las AuNP@PDDA que para las AuNP@pVBA ( $\lambda_{\max}=538$  nm). En el caso de las AuNP@PDDA, se informó un diámetro de  $12\pm 2$  nm (Chen *et al.*, 2006) y, es por ello que se puede esperar un diámetro mucho mayor para AuNP@pVBA, por ejemplo  $>50$  nm. Esta diferencia de tamaño permitió una mejor cobertura de las AuNP@PDDA sobre los fMWCNT, mejorando la respuesta electroanalítica hacia  $\text{AH}^{\cdot}$ .

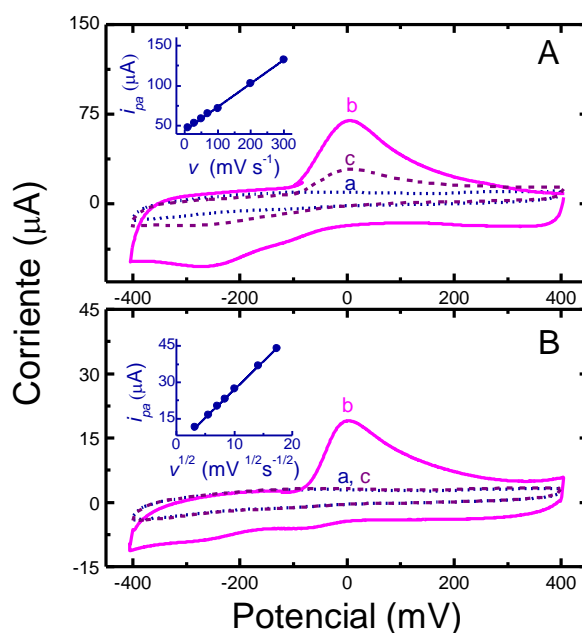


**Figura 4.4.** Espectro UV-Visible de las AuNPs recubiertas con PDDA o pVBA, obtenidos con una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

La **Figura 4.5 A** muestra los voltamperogramas cíclicos para el GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 a una velocidad de barrido de  $30 \text{ mV s}^{-1}$  obtenidos bajo diferentes condiciones. No se observó ningún pico de corriente de oxidación en ausencia de  $\text{AH}_2$  (**curva a**), pero con la adición de 1 mM de  $\text{AH}_2$  se observó un comportamiento típico para un proceso de oxidación irreversible con una corriente de pico anódica,  $i_{pa}\sim 71\pm 2 \mu\text{A}$ , a un potencial de pico anódico,  $E_{pa}\sim 7\pm 1 \text{ mV}$  (**curva b**). Sin embargo, después de enjuagar la superficie del electrodo con agua tridestilada y sumergirla en la celda electroquímica conteniendo



sólo la solución buffer, se observó una  $i_{pa} \sim 29 \pm 2 \mu\text{A}$  (59% menor) con el mismo potencial que la anterior (**curva c**), sugiriendo la adsorción de  $\text{AH}_2$  sobre la superficie del electrodo.



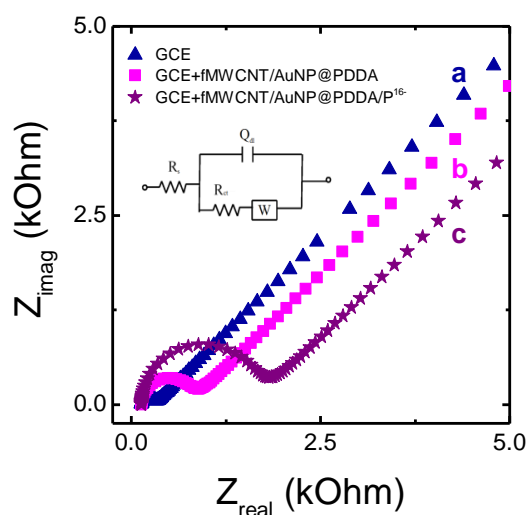
**Figura 4.5.** (A) Voltamperogramas cíclicos obtenidos con GCE modificados con fMWCNT+AuNP@PDDA a una velocidad de barrido de  $30 \text{ mVs}^{-1}$  antes **a**) y después **b**) de la adición de  $\text{AH}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7. **c**) Voltamperogramas cíclicos en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 obtenidos luego de limpiar el electrodo utilizado en **b**). (B) El mismo procedimiento mencionado anteriormente pero utilizando el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16</sup>.

El inserto de la Figura 4.5 A muestra la dependencia de  $i_{pa}$  con la velocidad de barrido ( $v$ ), en acuerdo con la **Ecuación 4.1** (Bard and Faulkner, 1944), donde  $n$  es el número de electrones transferidos;  $A$ , el área de superficie del electrodo ( $\text{cm}^2$ );  $\Gamma$ , la cobertura superficial de la especie adsorbida ( $\text{mol cm}^{-2}$ ),  $R$  es la constante ideal de los gases;  $F$  es la constante de Faraday, y  $T$  la temperatura. Para los datos representados se observó una dependencia lineal, indicando un proceso controlado por adsorción sobre el GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA.

$$i_{pa} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} v \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Dado que las fuerzas electrostáticas entre el  $\text{AH}^-$  y las  $\text{AuNP@PDDA}$  con carga positiva serían las responsables de la adsorción del sustrato, este efecto debería revertirse al modificar el signo de la carga eléctrica neta en la superficie del electrodo. Para ello, la superficie del sensor  $\text{GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA}$  se modificó nuevamente con una película del polianión  $\{[(\text{VBT})(\text{VPS})_{16}]^{16-}\}_{\approx 25}$  (denominado  $\text{P}^{16-}$ ).

Con el objetivo de evaluar los cambios superficiales, se realizó espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y los correspondientes diagramas de Nyquist se muestran en la **Figura 4.6**. Se trabajó con una solución equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM, utilizando GCE a) limpio y modificado con b)  $\text{fMWCNT+AuNP@PDDA}$  y c)  $\text{fMWCNT+AuNP@PDDA/P}^{16-}$ . Los espectros de impedancia se ajustaron con un circuito equivalente (**inserto Figura 4.6**) (Fernández-Sánchez *et al.*, 2005), conteniendo los elementos descritos en el Capítulo 2:  $R_s$ ,  $W$ ,  $Q_{dl}$ , y  $R_{ct}$  (Tulli *et al.*, 2018).



**Figura 4.6.** Diagramas de Nyquist en  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM para GCE a) limpio y modificados con b)  $\text{fMWCNT+AuNP@PDDA}$  y c)  $\text{fMWCNT+AuNP@PDDA/P}^{16-}$ . **Inserto:** Correspondiente circuito equivalente.

Se observó que al modificarse el electrodo con fMWCNT+AuNP@PDDA o fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>, los espectros EIS mostraron un semicírculo más grande en comparación con el GCE limpio, es decir una mayor R<sub>ct</sub> como consecuencia de la inmovilización de los nanocompósitos en la superficie del electrodo. Sin embargo, la R<sub>ct</sub> fue mayor en GCE conteniendo el P<sup>16-</sup>, probablemente como consecuencia de la repulsión electrostática entre el polímero y la cupla rédox.

La **Figura 4.5 B** muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> en buffer fosfato 0,1 M a pH 7. Tras la adición de AH<sub>2</sub> 1 mM, se observó una *i<sub>pa</sub>* a un valor de potencial similar que el observado para la superficie modificada sin P<sup>16-</sup> (**curva b**), pero en este caso, después de enjuagar la superficie con agua tridestilada, no se observó ningún pico de corriente (**curvas a y c**). Este resultado confirma que el analito no se adsorbe sobre la superficie de fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>, sugiriendo que el P<sup>16-</sup> podría actuar como una barrera electrostática que evita la interacción de AH<sup>-</sup> a las AuNP@PDDA cargadas positivamente. El **inserto de la Figura 4.5 B** muestra el incremento lineal de la *i<sub>pa</sub>* con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ), de acuerdo a la **Ecuación 4.2** (Hu and Kuwana, 1986; Antoniadou *et al.*, 1989), indicando la existencia de un proceso controlado por difusión. En esta ecuación,  $\alpha_A$  es el coeficiente de transferencia anódica,  $n_a$  es el número de moles de electrones transferidos en la etapa determinante de la velocidad,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $C_0$  es la concentración del analito en el seno de la solución, respectivamente.

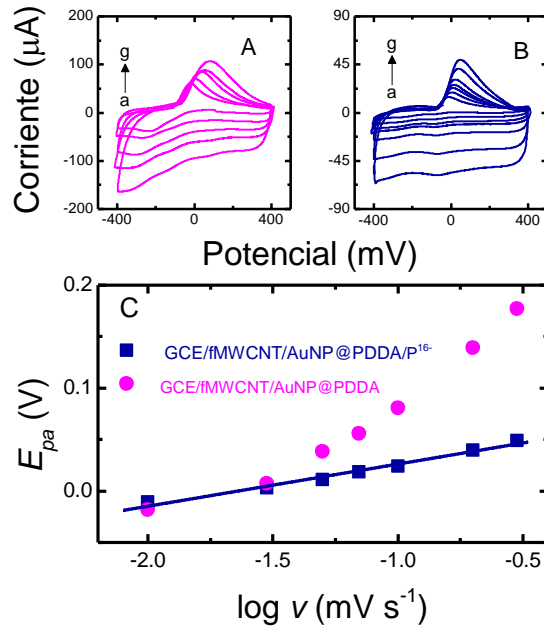
$$i_{pa} = 3,01 \times 10^5 A C_0 n (\alpha_A n_a D)^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

La **Figura 4.7** muestra los voltamperogramas cíclicos para diferentes velocidades de barrido utilizando los sensores GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA (**A**) y GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> (**B**). Se observó en ambos casos que a medida que aumenta la velocidad de barrido, el  $E_{pa}$  se desplaza hacia potenciales más positivos. Sin embargo, el efecto fue menos marcado en el caso del electrodo modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>, indicando que la reacción de oxidación de AH<sub>2</sub> se encuentra más favorecida en esta superficie de trabajo (**C**). El coeficiente de

transferencia anódica,  $\alpha_A$  para este último sensor se calculó como  $0,72 \pm 0,05$  usando la **Ecuación 4.3** (Bard and Faulkner, 1944), este valor concuerda con los encontrados en bibliografía para la oxidación de  $AH_2$  ('Electrocatalytic Determination of Ascorbic Acid on a Glassy Pentacyanonitrosylferrate', 2005; Wantz, Banks and Compton, 2005).

$$E_{p,a} = K - \frac{2,303 RT}{2\alpha_A n \alpha_F} \log v \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$\text{Siendo } K = E^{o'} - \frac{RT}{\alpha_A n \alpha_F} \left( 0,78 - \frac{2,303}{2} \log \left( \frac{\alpha_A n \alpha_F D}{k^2 RT} \right) \right)$$

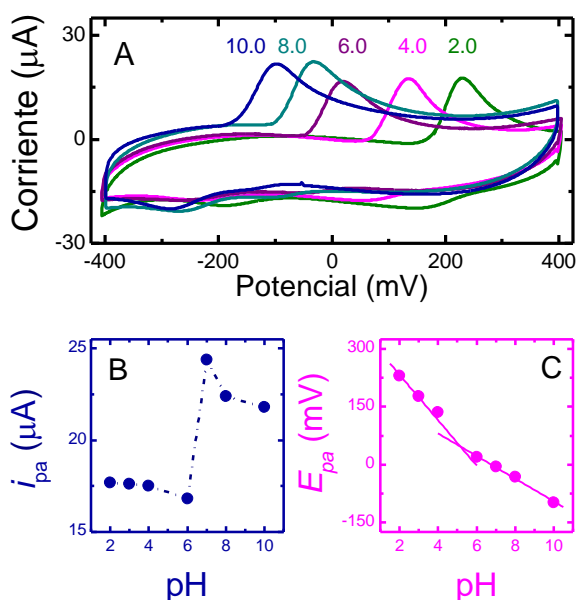


**Figura 4.7.** Voltamperogramas cíclicos en función de la velocidad de barrido (**a:** 10, **b:** 30, **c:** 50, **d:** 70, **e:** 100, **f:** 200, and **g:** 300  $\text{mV s}^{-1}$ ) de una solución de  $AH_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 obtenidos con los electrodos **(A)** GCE/fMWCNT/AuNP@PDDA, y **(B)** GCE/fMWCNT/AuNP@PDDA/P<sup>16</sup>. **(C)** Variación de  $E_{pa}$  vs  $\log v$  para ambos electrodos modificados, junto con el ajuste con la Ecuación 4.3 para los datos del sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16</sup>.

### 4.3.2. Efecto del pH utilizando GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>

La **Figura 4.8 A** muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en soluciones de AH<sub>2</sub> 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a diferentes valores de pH. Se observó que la  $i_{pa}$  fue menor en condiciones ácidas que en condiciones neutras y básicas (**Figura 4.8 B**), mientras que se observó una disminución continua del  $E_{pa}$  con el pH (**Figura 4.8 C**). Para un proceso redox  $r\text{Red} \rightarrow o\text{Ox} + n\text{e}^- + m\text{H}^+$  a 25 °C, donde r y o representan los coeficientes estequiométricos de las formas reducida (Red) y oxidada (Ox) del analito, y n y m son el número de electrones y los protones transferidos, respectivamente, la **Ecuación 4.4** de Nernst predice una dependencia lineal de  $E_{pa}$  con el pH, incluso para procesos irreversibles registrados a una velocidad de barrido baja (Bard and Faulkner, 1944).

$$E_{pa} = E^0 + \frac{0,059}{n} \log\{[\text{Ox}]^o / [\text{Red}]^r\} - \frac{0,059m}{n} \text{pH} \quad (\text{Ec. 4.4})$$



**Figura 4.8.** (A) Voltamperogramas cíclicos en una solución de buffer fosfato 0,1 M a diferentes pH. (B) y (C) variación con el pH de la  $i_{pa}$  y  $E_{pa}$ , respectivamente.

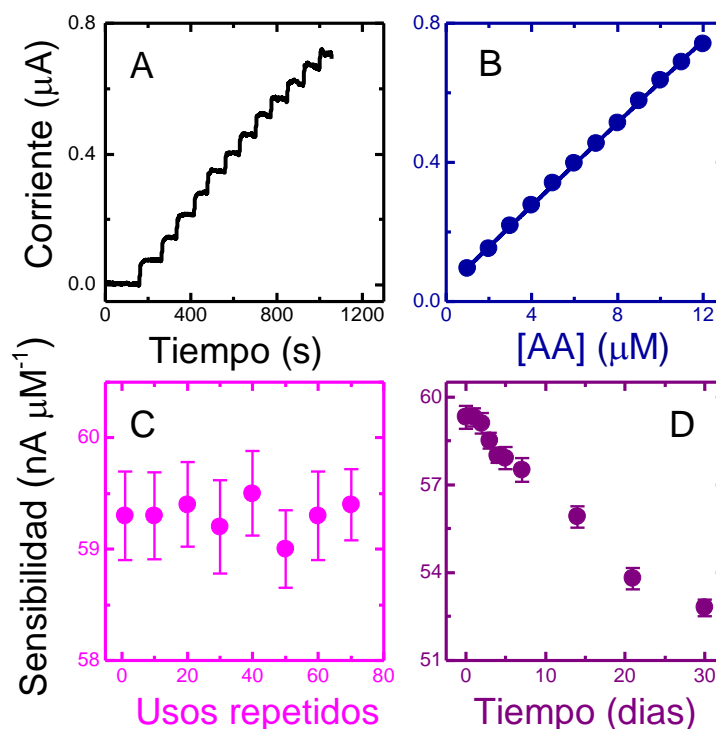
El cambio de pendiente de los datos representados en la **Figura 4.8 C** es una consecuencia del equilibrio ácido-base entre  $\text{AH}_2$  y  $\text{AH}^-$  ( $\text{pK}_{\text{a}1}=4,2$ ) (Dryhurst *et al.*, 1982), donde la concentración de cada especie presente depende del pH. Por lo tanto, en el rango de pH por debajo del valor del  $\text{pK}_{\text{a}1}$  el ajuste lineal de la **Ecuación 4.4** arrojó una pendiente de  $-58,5 \pm 0,2$  mV, indicando la transferencia de un número equivalente de moles de protones y electrones durante la oxidación electroquímica de  $\text{AH}_2$ , es decir, una relación  $m/n=1$ . En cambio, a valores de pH por encima del  $\text{pK}_{\text{a}1}$  la pendiente disminuyó a  $-29,4 \pm 0,3$  mV, es decir, una relación  $m/n=1/2$ , lo que demuestra la participación del doble de moles de electrones por protón transferido en la reacción. Este comportamiento encaja perfectamente con la reacción global de oxidación de  $\text{AH}_2$  para producir ácido deshidroascórbico (DHA) (Feng Hu and Kuwana, 1986). Por lo tanto, la oxidación de  $\text{AH}_2$  en el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> implica dos moles de electrones independientemente del pH.

### 4.3.3. Parámetros analíticos del sensor

#### GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>

La **Figura 4.9 A** muestra la corriente estacionaria obtenida con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> después de adiciones sucesivas de solución estándar de  $\text{AH}_2$  1  $\mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 7. El electrodo mostró una curva de calibración lineal ( $R^2=0,999$ ) en el rango de concentración estudiado (**Figura 4.9 B**), con un valor de  $s=59,3 \pm 0,4$  nA  $\mu\text{M}^{-1}$ . El límite de detección se estimó en  $53 \pm 2$  nM ( $\cong 9$  ppb). La reproducibilidad del sensor se evaluó determinando la sensibilidad de tres electrodos diferentes preparados de la misma manera, y se obtuvo aproximadamente el 5% de desviación estándar (SD), lo que indica la buena reproducibilidad en la preparación del sensor. Además, la sensibilidad del mismo sensor se midió secuencialmente más de 70 veces y fue altamente constante a través del conjunto de mediciones dentro del 0,25% de SD (**Figura 4.9 C**). Finalmente, la estabilidad del sensor se probó midiendo la sensibilidad durante 30 días, y se observó que el valor de

sensibilidad inicial disminuyó aproximadamente un 5% y un 11% después de 7 y 30 días de almacenamiento en la solución buffer, respectivamente (**Figura 4.9 D**).



**Figura 4.9.** (A) Cronoamperograma con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> a 50 mV tras la adición secuencial de  $\text{AH}_2$   $1 \mu\text{M}$  en buffer fosfato 0,1 M a pH 7; y (B) curva de calibración. Las gráficas (C) y (D) muestran la variación de la sensibilidad del electrodo en función del número de veces utilizado (solo se representaron gráficamente los valores cada diez veces de uso consecutivo) y durante varios días de uso, respectivamente.

La **Tabla 4.1** compara los parámetros analíticos para la detección de  $\text{AH}_2$  del sensor seleccionado con otros informados en la literatura. Se observó que la sensibilidad y el bajo límite de detección del sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> son notables, lo que demuestra su excelente rendimiento analítico para la aplicación en muestras reales. Sin embargo, para cumplir el último propósito, también se debe lograr una gran selectividad hacia el analito de interés. En este sentido, se ha informado que la

dopamina, la glucosa y el paracetamol pueden interferir en la detección de AH<sub>2</sub> (Dursun and Gelmez, 2010; Karimi-Maleh *et al.*, 2014).

**Tabla 4.1.** Parámetros analíticos para algunos electrodos no enzimáticos para la detección de ácido ascórbico.

Composición del electrodo <sup>[a]</sup>	Sensibilidad (nA μM <sup>-1</sup> )	Límite de detección (μM)	Rango lineal (μM)	Ref.
EPPGE	65,0±0,2	71±2	200-2200	(Wantz <i>et al.</i> , 2005)
TBQ-MCPE	21,2±0,3	0,62±0,02	4-10	(Zare <i>et al.</i> , 2005)
NiPCNF/Al	52,0±0,2	0,30±0,03	1-5000	(Pournaghi-Azar and Razmi-Nerbin, 2001)
PtNP-MWCNT/GCE	17,2±0,3	0,20±0,03	23-880	(Dursun and Gelmez, 2010)
CoPCNF/GCE	n.r. <sup>[b]</sup>	8,0±0,2	10-120	(Sabzi and Pournaghi-Azar, 2005)
GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P <sup>16-</sup>	59,3±0,4	0,053±0,002	1-12	Este trabajo

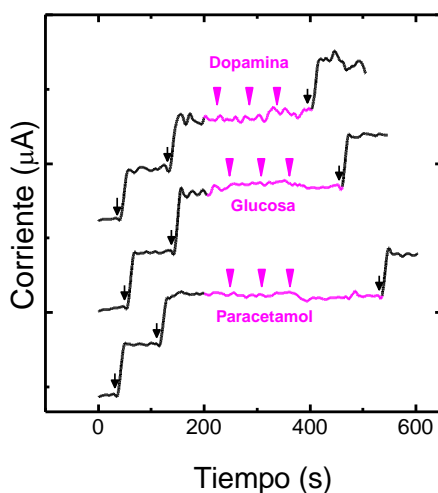
<sup>[a]</sup> EPPGE: electrodo edge plane de grafito pirolítico; TBQ-MCPE: electrodo de pasta de carbono modificado con tetrabromo-p-benzoquinona; NiPCNF/Al: electrodo de niquelpentacianonitrosilferrato/aluminop; PtNP-MWCNT/GCE: electrodo de carbono vítreo modificado con nanopartículas de platino y nanotubos de pared múltiple; CoPCNF/GCE: electrodo de carbono vítreo modificado con pentacianonitrosilferrato de cobalto.<sup>[b]</sup>n.r.: no reportado.

La **Figura 4.10 A** muestra la respuesta de corriente obtenida a 50 mV con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> en una solución de buffer fosfato 0,1 M a pH 7 en presencia de alícuotas de AH<sub>2</sub> 1 μM intercaladas con la adición de dopamina, glucosa y paracetamol 0,5, 1 y 10 μM. Se observó que los compuestos analizados no provocaron ningún efecto de interferencia, indicando la alta capacidad selectiva del sensor. Además, la detección de AH<sub>2</sub> se recuperó completamente después de la adición



de 1  $\mu\text{M}$  del analito, confirmando que la superficie del electrodo no se vio afectada por la presencia de los interferentes.

En conjunto, estos resultados ilustran que el electrodo desarrollado tiene características muy adecuadas para la detección analítica de  $\text{AH}_2$ , incluso en presencia de otros compuestos, por lo que podría ser potencialmente aplicable en muestras de alimentos.



**Figura 4.10.** Cronoamperogramas obtenidos con el sensor GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/ $\text{P}^{16-}$  a 50 mV en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 luego de la adición de alícuotas de  $\text{AH}_2$  1  $\mu\text{M}$  de (triángulos negros) en la adición secuencial de interferentes 0,5; 1 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente (triángulos magenta).

## 4.4. CONCLUSIONES

En el presente capítulo, se presenta el diseño y desarrollo de un sensor amperométrico mediante la modificación de una superficie de electrodo de carbono vítreo (GCE) con una película de nanocompósito, para la detección altamente selectiva y sensible de ácido ascórbico ( $\text{AH}_2$ ) sin procesos de adsorción del analito, permitiendo la utilización del sensor varias veces. Esto se logró mediante la cobertura final con un polianión ADN-bioinspirado del nanocompósito formado por una mezcla de nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados (fMWCNT) y nanopartículas de oro

estabilizadas con PDDA (AuNP@PDDA), indicando la relevancia de las interacciones electrostáticas entre el analito y la superficie electroactiva. La sensibilidad del dispositivo fue de  $59,3 \pm 0,4 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$  con un bajo límite de detección de  $53 \pm 2 \text{ nM}$ , valores casi comparables con los obtenidos para sensores electroanalíticos ultrasensibles (Tulli *et al.*, 2018) pero incluso con mejores propiedades de detección que otros electrodos de carbono nanoestructurados (Sabzi and Pournaghi-Azar, 2005; Wantz *et al.*, 2005; Dursun and Gelmez, 2010).

La reacción global de oxidación de  $\text{AH}_2$  sobre el GCE/fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> en pH ácido y neutro fue la misma que el observado en GCE (Feng Hu and Kuwana, 1986) y electrodos metálicos (Rueda *et al.*, 1978), involucrando dos moles de electrones transferidos para producir ácido deshidroascórbico (DHA). El electrodo desarrollado fue capaz de cuantificar  $\text{AH}_2$  incluso en presencia de interferentes típicos o en matrices complejas, con excelente repetibilidad y estabilidad, lo que confirma su idoneidad para aplicaciones analíticas.

En resumen, los resultados actuales confirman la importancia de la arquitectura del diseño supramolecular de la película de nanocompósitos depositados para obtener sensores electroanalíticos eficientes y su potencial aplicabilidad en muestras de alimentos.



# Capítulo 5

---

## Aplicación del sensor desarrollado en la detección de ácido ascórbico en extractos vegetales sometidos a estrés abiótico

### 5.1. INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico ( $AH_2$ ) es un compuesto hidrosoluble, con una estructura tipo  $\gamma$ -lactona, cuyo enantiómero L representa la forma bioquímica y fisiológicamente activa. Este ácido posee dos protones dissociables ( $pK_a$  4,2 y 11,3); por lo tanto, en condiciones fisiológicas, se encuentra como anión ascorbato. Se conoce que el  $AH_2$  está involucrado en el mecanismo de absorción de hierro, la síntesis de colágeno y la activación de la respuesta inmune, participa en la curación de heridas y la osteogénesis y ayuda a mantener los capilares, los huesos y dientes (Fox and Cameron, 1989; Cathcart, 1991; Sies *et al.*, 1992; Padayatty *et al.*, 2003; Erdurak-Kiliç *et al.*, 2006; Bhagavan, 2011). Además, este compuesto es conocido por sus propiedades reductoras,

y se oxida fácilmente a ácido deshidroascórbico (DHA), debido a que actúa como un poderoso antioxidante que combate las enfermedades inducidas por los radicales libres (Fox and Cameron, 1989; Cathcart, 1991; Sies *et al.*, 1992; Padayatty *et al.*, 2003; Erdurak-Kiliç *et al.*, 2006; Bhagavan, 2011). Estudios realizados demostraron que la capacidad antioxidante del AH<sub>2</sub> se debe a que puede eliminar: i) el oxígeno molecular antes de la oxidación de los compuestos fenólicos y ii) los radicales libres reaccionando rápidamente con ellos para formar otros radicales poco reactivos que no se propagan fácilmente (Bradshaw *et al.*, 2011).

Las plantas y la mayoría de los animales sintetizan el ascorbato a partir de la glucosa. Debido a una mutación genética que induce una deficiencia de L-gulonolactona oxidasa, enzima que convierte la glucosa en ácido ascórbico en el hígado, los humanos y algunos otros primates no pueden sintetizar ácido ascórbico, por lo que deben incorporarlo a través de la dieta (Valpuesta and Botella, 2004).

El consumo de frutas y verduras mínimamente procesadas ha aumentado considerablemente en todo el mundo en los últimos años, y es la fuente más utilizada para incorporar tanto AH<sub>2</sub> como otros antioxidantes en nuestra dieta. Los cambios en los estilos de vida y los hábitos alimenticios, así como la preferencia por productos con menos aditivos, han resultado en una mayor demanda de dichos productos. Estos alimentos mínimamente procesados frescos son una excelente opción, debido a que no modifican significativamente las propiedades de las frutas y verduras, comparadas con las frescas, es decir, aquellas que no sufren ningún tratamiento.

A pesar de las ventajas en términos nutricionales y frescura, los alimentos mínimamente procesados tienen la limitación de un rápido deterioro de la calidad y una vida útil corta debido al daño tisular causado por el procesamiento y la contaminación cruzada. El procesamiento mínimo acelera los cambios fisiológicos, provocando un aumento en la respiración y la tasa de transpiración, lo que resulta en una mayor pérdida de agua del tejido con la subsiguiente deshidratación; pérdida de la firmeza, incremento del pardeamiento enzimático, promoviendo el crecimiento de microorganismos y el deterioro que influyen en la calidad y la vida útil (Ahvenainen, 1996; Lu *et al.*, 2005). Los informes también revelaron que las posibilidades de enfermedades transmitidas por

los alimentos asociadas con el consumo de productos mínimamente procesados contaminados son muy altas (Barry-Ryan and O'Beirne, 1998). Se han utilizado diversos métodos físicos y químicos o combinación de dos o más métodos, con el objetivo de mantener la calidad de las frutas y verduras mínimamente procesadas y al mismo tiempo inhibir el crecimiento microbiano no deseado (Theis, 2004; Ahn *et al.*, 2005; Artés *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2011).

Como se mencionó en el Capítulo 3, uno de los métodos utilizados para descontaminar, controlar el crecimiento de microorganismos y mantener la calidad en productos enteros y recién cortados, es la radiación ultravioleta (UV). En este aspecto, existen algunos estudios que reportaron sobre el efecto de la aplicación de radiación UV-C en berenjenas (*Solanum melongena L.*). Dicho vegetal, presenta muchas propiedades benéficas para la salud humana, como los efectos antioxidantes, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, neuroprotectores y cardioprotectores (Plazas *et al.*, 2013). Estas propiedades se han atribuido a su alto contenido de compuestos antioxidantes.

Por lo tanto, en el presente capítulo se evalúa la aplicación del sensor desarrollado en la detección del contenido de  $AH_2$  en berenjenas sometidas a diferentes intensidades de radiación UV-C.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Tanto los reactivos utilizados como la preparación del sensor amperométrico para las medidas electroquímicas se describieron en el Capítulo 4.

### **5.2.1. Materiales**

El ácido tricloro acético (TCA), 2,2'-dipiridil y el cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) fueron obtenidos de Biopack. El ácido fosfórico y etanol se adquirieron de Dorwill.

## 5.2.2. Medidas espectroscópicas

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron usando un espectrofotómetro JASCO V-630 (Japón). El método espectrofotométrico de Kampfenkel (Kampfenkel *et al.*, 1994) se utilizó para validar las determinaciones electroquímicas. El ensayo está basado en la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  por el  $\text{AH}_2$  y la detección espectroscópica del  $\text{Fe}^{2+}$  acomplejado con el 2,2'-dipiridil. Para esto, primero, se realizó una curva de calibración, utilizando diferentes volúmenes de una solución estándar de  $\text{AH}_2$  y agregándole buffer fosfato 0,2 M a pH 7 hasta completar un volumen final de 1 mL. Posteriormente, se agregó 1 mL de TCA al 10%, 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 42%, 800  $\mu\text{L}$  de 2,2'-dipiridil (en etanol al 70% v/v) al 4% y 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  al 3%. La mezcla se homogeneizó y se incubó a 42 °C durante 45 minutos y, finalmente, se midió la absorbancia a 525 nm<sup>4</sup>.

## 5.2.3. Preparación de las muestras

Las berenjenas moradas (*Solanum melongena L.*) (**Figura 5.1**) fueron adquiridas en un mercado local. La preparación de las muestras, el protocolo de radiación y el procedimiento para el almacenamiento fueron idénticos a los descritos en el Capítulo 3.

Para preparar los extractos de berenjenas para las medidas electroquímicas, se procedió a la homogeneización de 8 g con 12 mL buffer fosfato 0,1 M a pH 2. Luego, los extractos fueron filtrados (Whatman® Grade 589/2), centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos y almacenados en heladera a 4 °C hasta su uso. Por último, la detección de

---

<sup>4</sup> Estos datos fueron obtenidos a través de una colaboración con el grupo de trabajo dirigido por la Dra. Silvia del C. Rodríguez en el Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL), CONICET-UNSE. En particular, los experimentos fueron realizados por la Ing. Laura Lemos, en el marco del desarrollo de su tesis doctoral. Agradecemos el enorme aporte y colaboración.

AH<sub>2</sub> se llevó a cabo en 90 µL del sobrenadante de los extractos de berenjena, y las concentraciones se determinaron mediante el método de adición estándar.

Para las medidas espectrofométricas, los extractos de berenjena se prepararon homogeneizando 8 g con 12 mL de TCA (6% w/v). Luego los extractos fueron filtrados (Whatman® Grade 589/2), centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos y almacenados en heladera a 4 °C hasta su uso. Finalmente, la detección del AH<sub>2</sub> se llevó a cabo en 200 µL del sobrenadante.



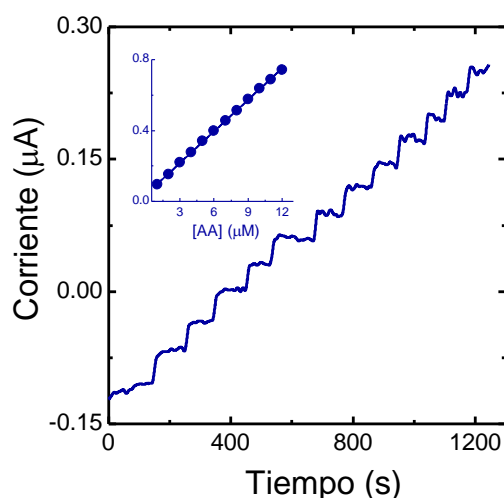
**Figura 5.1.** Vegetales utilizados para determinar el contenido de ácido ascórbico.

## **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.3.1. Detección de ácido ascórbico en extractos vegetales sometidos a estrés**

La **Figura 5.2** muestra la respuesta de la corriente en función del tiempo para el electrodo de carbono vítreo (GCE) modificado con un nanocompósito conteniendo nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados (fMWCNT), nanopartículas de oro recubiertas con PDDA (AuNP@PDDA), y un polímero aniónico ADN-bioinspirado (P<sup>16-</sup>), fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup>. La curva de calibración (**inserto Figura 5.2**) se llevó a cabo midiendo las corrientes estacionarias obtenidas tras adiciones sucesivas de AH<sub>2</sub> 1 µM en una celda electroquímica conteniendo buffer fosfato 0,1 M a pH 7 y un potencial de trabajo de 50mV.





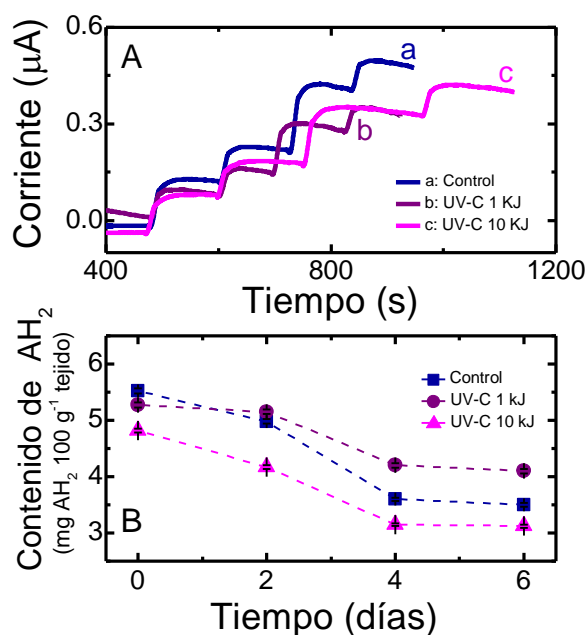
**Figura 5.2.** Cronoamperograma y correspondiente curva de calibración para el GCE modificado con fMWCNT+AuNP@PDDA/P<sup>16-</sup> en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para adiciones sucesivas de AH<sub>2</sub> 1 µM. Potencial de trabajo: 50 mV.

Como se describió en el Capítulo 4, el biosensor exhibió muy buenos parámetros analíticos obteniéndose una sensibilidad de  $59,3 \pm 0,4 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ , un rango de linealidad de hasta 12 µM y un límite de detección de  $53 \pm 2 \text{ nM}$  (equivalente a 9 ppb).

Con el sensor amperométrico desarrollado se procedió a la detección de AH<sub>2</sub> mediante el método de adición estándar. Para ello, se realizó el agregado sucesivo de dos alícuotas de AH<sub>2</sub> 1 µM, con el objetivo de verificar que el aumento de la corriente sea proporcional a la concentración del estándar y asegurar que las mediciones realizadas se encuentren en la región lineal de la curva de calibración. Luego, se añadió una alícuota de 90 µL de los extractos de berenjenas. Por último, se agregó nuevamente una alícuota de AH<sub>2</sub> 1 µM para determinar el porcentaje de recuperación aparente (%R<sub>A</sub>) de la señal del sensor, y evaluar si algunos de los componentes presentes en la muestra interfieren en la respuesta del sensor ya sea, aumentando o disminuyendo la señal de corriente (Tulli *et al.*, 2018).

La **Figura 5.3 A** muestra los perfiles de la corriente en función del tiempo para los extractos berenjena en el día 0. Se observó que, independientemente de la intensidad

de radiación UV-C aplicada (**curvas b y c**), el contenido de AH<sub>2</sub> disminuyó con respecto a las muestras control (**curva a**). Sin embargo, la disminución fue menor en aquellas muestras sometidas a una intensidad de radiación UV-C de 1 kJ/m<sup>2</sup> (**curva b**).

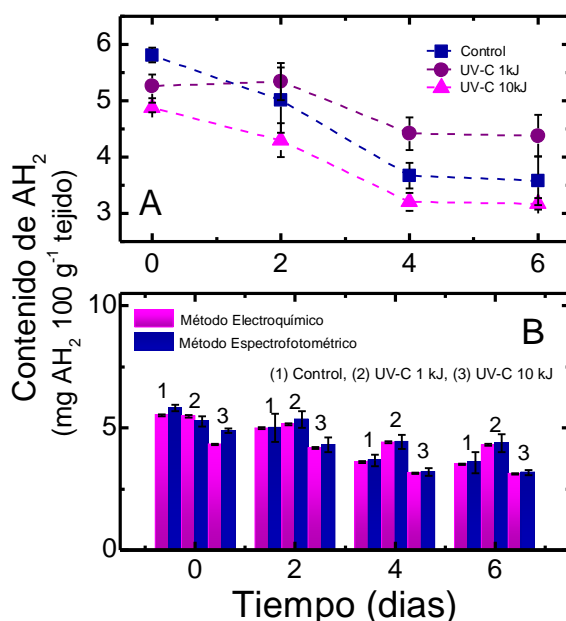


**Figura 5.3.** (A) Cronoamperogramas para el sensor seleccionado en 0,1 M de PBS pH 7 en extractos de berenjenas. Potencial de trabajo: 50 mV. (B) Contenido de AH<sub>2</sub> a lo largo del período de almacenamiento para los extractos utilizados.

La **Figura 5.3 B** muestra los contenidos de AH<sub>2</sub> obtenidos para todas las muestras de berenjenas sometidas a las diferentes intensidades de radiación, durante todo el período de almacenamiento. Se observó que, en todos los casos, el contenido de AH<sub>2</sub> disminuye a medida que transcurren los días de almacenamiento. Sin embargo, este descenso es más notorio en las muestras que fueron sometidas a una radiación más severa, es decir a las berenjenas irradiadas con una intensidad de 10 kJ/m<sup>2</sup> (**curva c**). Esto sugiere que debido al estrés aplicado, el metabolismo y el sistema de defensa de estos vegetales en las condiciones experimentales utilizadas dan lugar a una disminución en el contenido de AH<sub>2</sub>. Sin embargo, esta disminución no es tan marcada cuando las berenjenas son sometidas a una intensidad de 1 kJ/m<sup>2</sup>, manteniendo las

propiedades físicas y nutritivas por más tiempo, lo que se traduce en impacto benéfico en la salud al aplicarse este tratamiento bajo estas condiciones (Surjadinata and Cisneros-Zevallos, 2012).

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos con el sensor desarrollado, se realizó la determinación espectrofotométrica de los extractos de berenjenas durante todo el período de almacenamiento (**Figura 5.4 A**). Los datos obtenidos mediante el método de Kampfenkel fueron similares a los obtenidos en las determinaciones electroquímicas, no encontrándose diferencias significativas (**Figura 5.4 B**).



**Figura 5.4.** (A) Contenido de  $AH_2$  a lo largo del período de almacenamiento obtenido mediante el método espectrofotométrico en berenjenas. (B) Comparación de ambos métodos en los extractos utilizados.

En la **Tabla 5.1** se muestra el contenido de  $AH_2$  obtenido mediante ambas metodologías, los cuales fueron coincidentes con resultados similares encontrados en bibliografía (Luna Inca, 2004; Yoplac Tafur, 2012; Gutiérrez and Rodríguez, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2018a, 2018b). Se considera que no existen diferencias significativas

entre los dos conjuntos de experimentos. Sin embargo, en casi todos los casos, los valores del contenido de AH<sub>2</sub> en las muestras de los extractos vegetales determinados mediante técnicas electroquímicas fueron menores comparadas con el método espectrofotométrico. Esto se debe a que, a diferencia de la reacción de Kampfenkel, el sensor utilizado es más específico debido a las ventajas que poseen los mismos, las cuales fueron mencionadas anteriormente.

**Tabla 5.1.** Contenido de AH<sub>2</sub> expresados en mg 100 g<sup>-1</sup> tejido en extractos vegetales sometidos a estrés comparando los métodos electroquímico y espectrofotométrico.

Dia	Berenjenas control		Berenjenas UV-C 1 kJ/m <sup>2</sup>		Berenjenas UV-C 10 kJ/m <sup>2</sup>	
	Sensor	Espectrof.	Sensor	Espectrof.	Sensor	Espectrof.
0	5,52 ± 0,04	5,81 ± 0,13	5,47 ± 0,04	5,26 ± 0,21	4,32 ± 0,03	4,88 ± 0,10
2	4,98 ± 0,04	5,01 ± 0,58	5,15 ± 0,04	5,34 ± 0,33	4,17 ± 0,03	4,30 ± 0,30
4	3,60 ± 0,03	3,67 ± 0,23	4,40 ± 0,04	4,42 ± 0,29	3,15 ± 0,02	3,20 ± 0,16
6	3,50 ± 0,03	3,83 ± 0,43	4,30 ± 0,04	4,38 ± 0,37	3,12 ± 0,02	3,17 ± 0,10

## 5.4. CONCLUSIONES

El sensor desarrollado pudo ser utilizado para evaluar el cambio en el contenido de AH<sub>2</sub> en extractos de berenjenas sometidos a las diferentes intensidades de radiación UV, y los resultados fueron comparables a los obtenidos mediante el método de espectrofotométrico de Kampfenkel. Sin embargo, se observó que la detección de AH<sub>2</sub> utilizando el sensor nos proporciona una serie de ventajas con respecto al método espectrofotométrico, ya que es posible trabajar con volúmenes de muestra menores, por lo tanto, un menor tiempo de análisis. Además, nos proporciona una mayor sensibilidad, selectividad y menor límite de detección.

Por otro lado se observó que en el caso de las berenjenas, al ser expuestas a la radiación UV-C de 1 kJ/m<sup>2</sup>, el contenido de AH<sub>2</sub> disminuye. Sin embargo, si bien una

intensidad de radiación UV-C de  $1 \text{ kJ/m}^2$  provocó una disminución en el contenido de  $\text{AH}_2$ , esta fue mucho menor en comparación a las otras muestras.

Los resultados son coincidentes con los informados en la bibliografía, encontrándose un comportamiento similar en extractos de berenjenas (Zaro, 2014). Es por ello que los resultados expuestos anteriormente son interesantes debido a que la radiación UV-C aplicada puede utilizarse como una herramienta simple para proporcionar una menor disminución en el contenido de  $\text{AH}_2$  en vegetales MPF, manteniendo por un mayor período de tiempos sus propiedades físicas, así como también su valor nutritivo.



# Capítulo 6

---

En búsqueda de nuevos materiales para el diseño y desarrollo de un (bio)sensor dual y su aplicación en alimentos

## **6.1. INTRODUCCIÓN**

En los capítulos anteriores se presentó el diseño y desarrollo de dos sensores para la detección de antioxidantes en extractos vegetales. Primero se desarrolló un biosensor amperométrico mediante la inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano picante, que permitió la detección y cuantificación de polifenoles en extractos de zanahoria y berenjenas. Luego se presentó el desarrollo de un sensor amperométrico mediante la utilización de materiales nanoestructurados para la detección y cuantificación de ácido ascórbico en extractos de berenjena.

En el presente capítulo se expone el diseño y desarrollo de un (bio)sensor dual utilizando materiales nanoestructurados. Con este propósito se combinaron las estrategias planteadas hasta el momento, es decir, un electrodo modificado que pueda utilizarse como sensor o como un biosensor.

Para la construcción del (bio)sensor se utilizaron materiales de sílice mesoporosa, un material que ha adquirido una gran relevancia en las últimas décadas (Hasanzadeh *et al.*, 2012; Walcarius, 2013). Particularmente, el MCM-41 (de sus siglas en inglés: Mobil Composition of Matter) es uno de los materiales porosos más comúnmente utilizados para fines electroquímicos debido a su bajo costo de síntesis, estabilidad, versatilidad, su estructura hexagonal bien ordenada con poros uniformes que varían de 2 a 10 nm y una buena relación de área/volumen (Walcarius, 2013; Cuello *et al.*, 2015), lo que permite mejorar el rendimiento de los electrodos modificados con sílice (Švancara *et al.*, 2012). Sin embargo, el MCM-41 puro no tiene suficiente actividad intrínseca como catalizador (Cuello *et al.*, 2015). En este contexto, la síntesis de sílice mesoporosa con metales incrustados en los nanocanales o dentro del marco poroso son una alternativa para la obtención de un material MCM-41 electroactivo con propiedades catalíticas/electrocatalíticas mejoradas (Dai *et al.*, 2007; Hasanzadeh *et al.*, 2013; Lu and Kawamoto, 2014).

Considerando que hasta el momento no se trabajó con estos materiales en nuestro grupo, se procedió a estudiar los materiales de sílice mesoporosa inmovilizando la glucosa oxidasa debido a que su mecanismo de reacción es ampliamente conocido, es una enzima muy estable y capaz de soportar condiciones extremas de pH y temperatura. Además, tanto la glucosa como el peróxido de hidrógeno, el cual es producto de otras reacciones enzimáticas como las generadas por las catalasas, son analitos que juegan un rol importante en el control de calidad de los alimentos (Chen *et al.*, 2014; Zaidi and Shin, 2016).

Por lo tanto, en el presente capítulo informamos el desarrollo de un (bio)sensor dual analizando el efecto de la combinación de un material MCM-41 dopado con 2,5% en peso de hierro y/o glucosa oxidasa en una matriz de carbono con aplicación en la detección de peróxido de hidrógeno y glucosa.



## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Materiales**

El polvo de grafito (grado 38) y el aceite mineral se adquirieron de Fisher y Aldrich, respectivamente. La glucosa oxidasa, (EC 1.1.3.4, 157,500 unidades  $\text{g}^{-1}$  de sólido, Tipo X-S de *Aspergillus niger*) y el ácido ascórbico se adquirieron en Sigma Aldrich. Los materiales mesoporosos, dopado con hierro y sin dopar, fueron sintetizados por investigadores del Centro de Investigación y Tecnología Química (CITeQ), Universidad Tecnológica Nacional (UTN-CONICET), Facultad Regional Córdoba, Argentina, de acuerdo a un protocolo estandarizado (Cuello *et al.*, 2015). El peróxido de hidrógeno al 30%, la glucosa y las sales de sodio del buffer fosfato  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se obtuvieron de J.T. Baker; mientras que el ácido úrico y el paracetamol se adquirieron de Merck y de A.N.M.A.T. Argentina, respectivamente. Se utilizó agua tridestilada para preparar todas las soluciones.

### **6.2.2. Medidas electroquímicas**

Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo según la descripta en el Capítulo 2. En este caso se utilizaron como electrodos de trabajo electrodos de pasta de carbono (CPE) modificados con materiales mesoporosos y GOx como electrodos de trabajo. Se utilizó una solución de buffer fosfato 0,1 M a pH 7 como electrolito soporte y la temperatura de trabajo fue de 25 °C.

Las curvas de corriente en función del potencial, entre -300 y 800 mV, fueron obtenidas midiendo la corriente estacionaria para cada potencial a una determinada concentración de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Los estudios de cronoamperometría se realizaron bajo agitación magnética, aplicándose un potencial determinado. La señal de corriente se registró en función del tiempo después de la adición del analito ( $\text{H}_2\text{O}_2$  o glucosa).

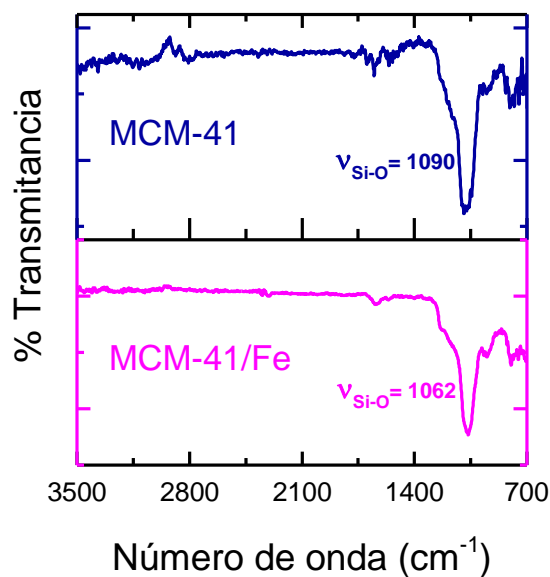
Las mediciones de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se llevaron a cabo utilizando una solución de una cupla rédox de  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM +  $K_4[Fe(CN)_6]$  5 mM preparada en KCl 0,1 M. La respuesta de impedancia en función de la frecuencia de perturbación se obtuvo aplicando un potencial con una amplitud de  $\pm 5$  mV a  $\pm 10$  mV, manteniendo así la condición de estado estacionario del sistema. Dicha perturbación fue aplicada en forma superpuesta con un potencial constante de polarización de 200 mV en un rango de frecuencias de 0,05 Hz - 10 kHz.

### 6.2.3. Mediciones espectroscópicas

Los espectros de absorción de infrarrojo se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier equipado con un accesorio ATR (ATR-FTIR) como se describió en el Capítulo 2.

Los espectros UV-Vis se obtuvieron con el espectrofotómetro Agilent 8453 (Palo Alto, CA, EE. UU.), utilizando un kit comercial de glicemia enzimática (Wiener Lab) y se realizó una curva de calibración utilizando diferentes volúmenes de una solución estándar de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa, se agregó 1 mL del Reactivo A y agua destilada hasta completar un volumen final de 2 mL. Se incubó la muestra a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 505 nm.

La **Figura 6.1** muestra los espectros ATR-FTIR obtenidos para el material de sílice mesoporosa sin dopar (M) y dopado con hierro (MFe), donde se observa que la vibración de enlace Si-O a  $\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$  típica en estos materiales (Pálková *et al.*, 2010), tuvo un desplazamiento significativo cuando se dopó el material con hierro, sugiriendo un sutil reordenamiento de la estructura del material de sílice mesoporosa debido a interacciones intramoleculares con los centros de hierro.



**Figura 6.1.** Espectros ATR-FTIR para el material de sílice mesoporosa sin dopar (M) y dopado con hierro (MFe).

## 6.2.4. Preparación de los electrodos modificados

Los electrodos de pasta de carbono (CPE) modificados, se prepararon mezclando polvo de grafito, material mesoporoso dopado con hierro (MFe) y sin dopar (M) y aceite mineral durante 30 minutos en un mortero de ágata. Para los (bio)electrodos, la glucosa oxidasa (GOx) se mezcló previamente con el aceite mineral durante 5 minutos antes de incorporar el material mesoporoso y el polvo de grafito, y luego se mezcló durante 30 minutos más. Las proporciones de material sólido y aglutinante utilizado para preparar cada una de las pastas fueron 70 y 30, respectivamente, expresadas como % p/p. Las composiciones de los diferentes compuestos se detallan a continuación:

- ✚ Grafito en polvo/aceite mineral, 70:30.
- ✚ Grafito en polvo/M/aceite mineral, 63:7:30.
- ✚ Grafito en polvo/MFe/aceite mineral, 63:7:30.
- ✚ Grafito en polvo/GOx/aceite mineral, 65:5:30.
- ✚ Grafito en polvo/M/GOx/aceite mineral, 58:7:5:30.
- ✚ Grafito en polvo/MFe/GOx/aceite mineral, 58:7:5:30.

Las pastas obtenidas se empacaron en un tubo cilíndrico de teflón (3 mm i.d.) equipado con un tornillo de acero inoxidable como contacto eléctrico. La superficie del electrodo se pulió sobre un papel de filtro.

### **6.2.5. Determinación de glucosa en muestras reales**

La detección de glucosa se llevó a cabo en muestras de leche en polvo de marca “La Serenísima”, las cuales se adquirieron en un supermercado local. Para ello, se mezclaron 13 g de cada muestra con 100 mL de agua a 25 °C. Para verificar los posibles efectos de la matriz, se midió la recuperación relativa de la señal producida por una alícuota de glucosa 1 mM antes y después de la adición de 20 µL de la muestra (Burns *et al.*, 2002).

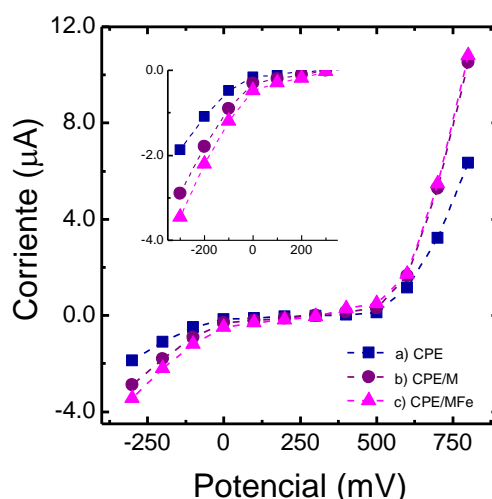
El método espectrofotométrico comercial de glicemia enzimática (Wiener Lab.) detallado anteriormente, se utilizó con el objetivo de validar las medidas electroquímicas. En todos los casos, la detección de la glucosa se llevó a cabo empleando 20 µL de muestra.

## **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.3.1. Caracterización del CPE modificado con M y MFe**

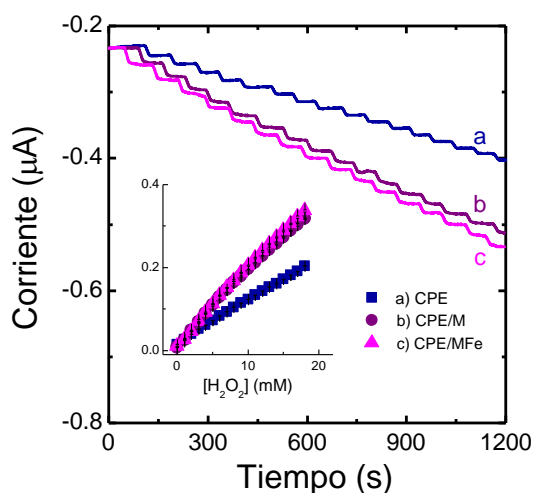
Se integró el material M y MFe dentro de la matriz de carbono con el objetivo de verificar una posible mejora en la señal de corriente hacia la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La **Figura 6.2** muestra las curvas de corriente en función del potencial entre -300 y 800 mV, obtenidas al medir la corriente estacionaria para cada potencial para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM de sobre diferentes electrodos: a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Para el caso de CPE, se observa una baja respuesta de corriente para los potenciales de oxidación y reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En contraste, se observa una mejora en las corrientes de oxidación y reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en CPE/M como en CPE/MFe. Esta tendencia puede atribuirse

a un aumento en el efecto catalítico hacia el proceso de oxidación/reducción del analito como consecuencia de las propiedades de los materiales mesoporosos incorporados. Este efecto es aún más notorio en presencia del MFe, debido a las características catalíticas del hierro (Cuello *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016). Por ello, es posible inferir que la mejora de este comportamiento electroquímico podría deberse a la actividad electrocatalítica de los centros de hierro Fe(III)/Fe(II) ubicados en MCM-41 (Lin and Leu, 2005). Los centros de hierro de Fe(II) pueden reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que genera Fe (III), que a su vez se reduce en la superficie del electrodo, en el potencial de trabajo. Este efecto comienza a ser más notorio a potenciales más negativos que -100 mV, potencial al cual se observa un incremento en las corrientes obtenidas para CPE/M y CPE/MFe en un factor de 1,9 y 2,5, respectivamente, comparadas con CPE. De esta manera, los electrodos modificados con M y MFe permiten la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a valores de potencial bajos, evitando potenciales interferencias de sustancias fácilmente oxidables que suelen estar presentes en muestras complejas. Por lo tanto, los resultados muestran que la incorporación de sílice mesoporosa y, especialmente el material dopado con hierro, mejora la respuesta hacia el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promoviendo un cambio en el electrodo que aumenta las corrientes de oxidación y reducción.



**Figura 6.2.** Perfiles de corriente en función del potencial para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 sobre a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. **Inserto:** Magnificación del gráfico .

La **Figura 6.3** muestra los cronoamperogramas obtenidos para alícuotas sucesivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM cuando se aplica un potencial de trabajo de -100 mV. La respuesta de corriente en función del tiempo se obtuvo para cada uno de los siguientes electrodos: a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Las curvas de calibración (**inserto Figura 6.3**), se obtuvieron graficando las corrientes estacionarias en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los diferentes parámetros analíticos se obtuvieron como se describió en los capítulos previos. Además, se determinó un tiempo de respuesta de alrededor de 15 segundos para todos los electrodos.



**Figura 6.3.** Cronoamperogramas y curvas de calibración para  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Potencial de trabajo: -100 mV.

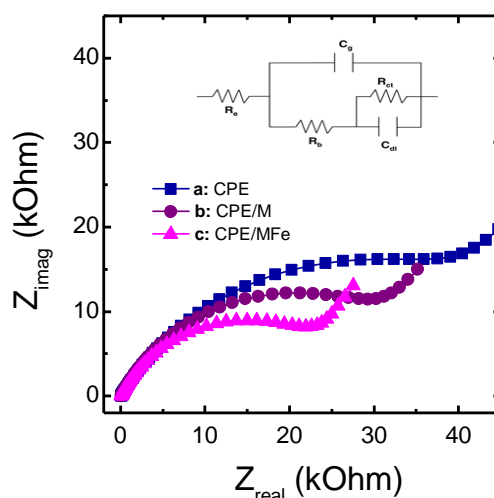
En la **Tabla 6.1** se muestran los parámetros analíticos de CPE, CPE/M y CPE/MFe, y se observa una mejora en las sensibilidades en CPE/M y CPE/MFe en comparación con CPE.

**Tabla 6.1.** Parámetros analíticos para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe a -100 mV.

Composición del electrodo	Sensibilidad ( $\mu\text{A M}^{-1}$ )	Rango lineal (mM)	Límite de detección (mM)
a) CPE	10,6 $\pm$ 0,2	0,66 - 12	0,20
b) CPE/MCM-41	19,1 $\pm$ 0,1	0,34 - 13	0,10
c) CPE/MCM-41-Fe	33,7 $\pm$ 0,2	0,22 - 12	0,07

Para una mejor comprensión del comportamiento electroquímico del CPE modificado con el material de sílice mesoporosa, el sistema también fue evaluado por EIS. La **Figura 6.4** muestra los diagramas de Nyquist, obtenidos para la cupla equimolar redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM en KCl 0,1 M, utilizando a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. Los parámetros se ajustaron utilizando un circuito equivalente (**inserto Figura 6.4**), que incluye los siguientes elementos:  $R_s$ , la resistencia del electrolito soporte;  $Q_{dl}$ , elementos de fase constante que representan la capacidad de la doble capa ( $C_1$ ,  $C_2$ ); y  $R_{ct}$ , la resistencia de transferencia de carga ( $R_1$ ,  $R_2$ ). El diagrama de Nyquist de cada compuesto muestra dos semicírculos capacitivos no completamente definidos que están asociados con un circuito RC en paralelo en el circuito equivalente propuesto.

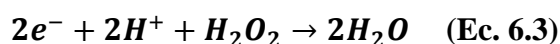
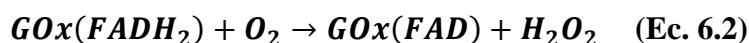
Se observó que las  $R_{ct}$  disminuyen cuando se incorporan M y MFe, comparadas con las  $R_{ct}$  para CPE. Este comportamiento puede asociarse a la disposición y el tamaño de los poros de la estructura del material de sílice mesoporosa lo cual facilita la difusión. Este efecto es aún más evidente cuando el material dopado con hierro está presente.



**Figura 6.4.** Diagramas de Nyquist obtenidos en  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  10 mM (KCl 0, 1 M) para a) CPE, b) CPE/M y c) CPE/MFe. **Inserto:** Circuito equivalente correspondiente.

### 6.3.2. Caracterización del CPE modificado con M y MFe y GOx

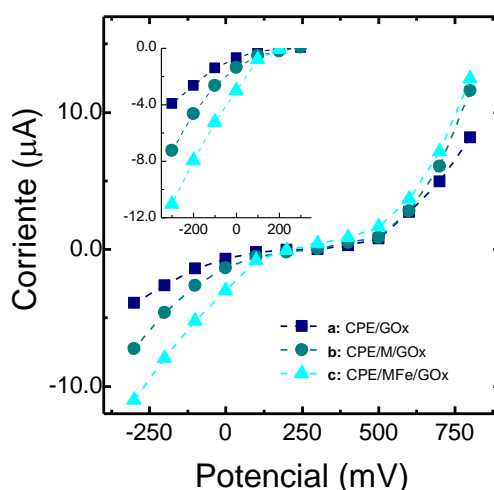
Se procedió a incorporar, además de los materiales mesoporosos, la enzima GOx a las pastas de carbono. El objetivo fue verificar si estas matrices eran capaces de generar un microambiente óptimo sin modificar la estructura de la enzima y, por lo tanto, mantener su actividad biológica. La cuantificación de la glucosa se basa en la detección electroquímica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado enzimáticamente. La sensibilidad del sensor depende de la respuesta electroquímica al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por lo tanto, un electrodo con un alto rendimiento catalítico hacia el  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría lograr una alta sensibilidad hacia la glucosa (Ecuaciones 6.1 – 6.3).





La **Figura 6.5** muestra las corrientes estacionarias para cada potencial para  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM sobre diferentes electrodos: a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Se observó que a potenciales más negativos que 0 mV, se produce un incremento en las señales de corriente de reducción, en un factor de 1,9 y 3,7, cuando se trabaja con CPE/M/GOx y CPE/MFe/GOx, respectivamente, en comparación con CPE/GOx.

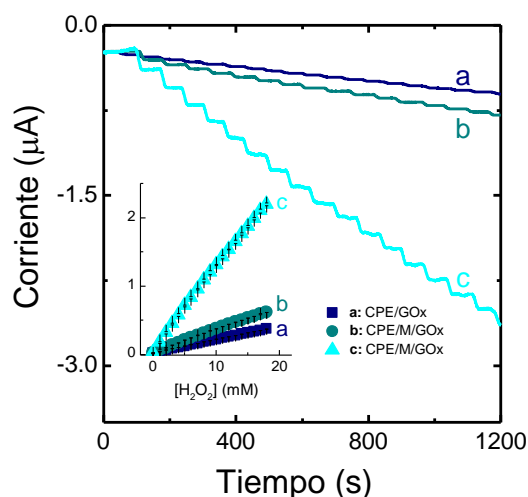
Este efecto puede deberse a que algunas proteínas, en este caso la GOx, tienen un efecto dispersivo (Comba *et al.*, 2012), el cual combinado con las propiedades de los materiales mesoporosos, provocarían una significativa mejora en la respuesta hacia el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 6.5.** Perfiles de corriente en función del potencial para  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 sobre a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. **Inserto:** Magnificación del gráfico.

La **Figura 6.6** muestra las señales de corriente en función del tiempo, obtenidas para el CPE modificado con los materiales mesoporosos y la GOx para la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, mientras que en el inserto se observan las curvas de calibración. La mayor sensibilidad se obtuvo para el electrodo de pasta modificado con MFe y GOx, con un

valor de  $123,8 \pm 0,8 \mu\text{A M}^{-1}$ . La pendiente de la curva de calibración mostró una relación lineal entre la corriente y la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta 12 mM ( $R^2=0,997$ ). El límite de detección fue de 0,02 mM, y el límite de cuantificación, 0,07 mM (**Tabla 6.2**).



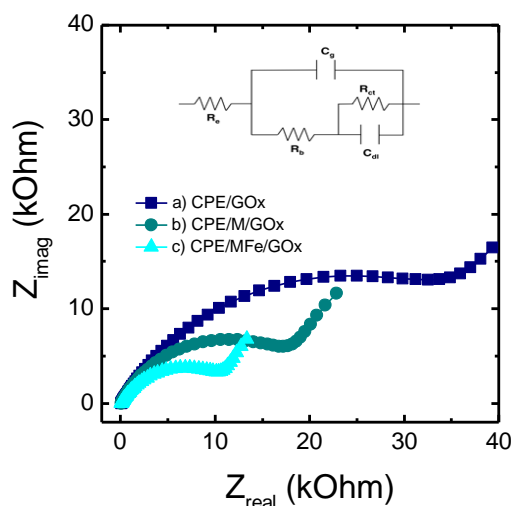
**Figura 6.6.** Cronoamperogramas y curvas de calibración para  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y c) CPE/MFe/GOx. Potencial de trabajo: -100 mV.

**Tabla 6.2.** Parámetros analíticos para  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe y con GOx a -100 mV.

Composición del electrodo	Sensibilidad ( $\mu\text{A M}^{-1}$ )	Rango lineal (mM)	Límite de detección (mM)
a) CPE/GOx	$19,8 \pm 0,2$	0,40 – 15	0,09
b) CPE/M/GOx	$19,7 \pm 0,1$	0,30 – 10	0,08
c) CPE/MFe/GOx	$123,8 \pm 0,8$	0,07 – 12	0,02

Como se hizo anteriormente, la EIS se llevó a cabo para investigar el comportamiento del CPE modificado con material de sílice mesoporosa y GOx. En la **Figura 6.7**, se muestran los diagramas de Nyquist para a) CPE/GOx, b) CPE/M/GOx y

c) CPE/MFe/GOx, teniendo en cuenta que el circuito equivalente utilizado para estos biocompósitos es el mismo que se utilizó anteriormente. Se observó que para el CPE/GOx, la  $R_{ct}$  es mayor que para CPE/M/GOx y CPE/MFe/GOx, lo que denota la influencia de la presencia de ambos componentes dentro de la matriz, mejorando la respuesta electroquímica del (bio)electrodo hacia la reducción del  $H_2O_2$ . La  $R_{ct}$  asociada con CPE/M/GOx y CPE/MFe/GOx disminuye, siendo 1,6 y 3,5 veces más pequeña, respectivamente, que la obtenida para CPE/GOx. Por lo tanto, estos resultados indican que la incorporación de la proteína y el material mesoporoso mejoran la respuesta electroquímica del (bio)electrodo.

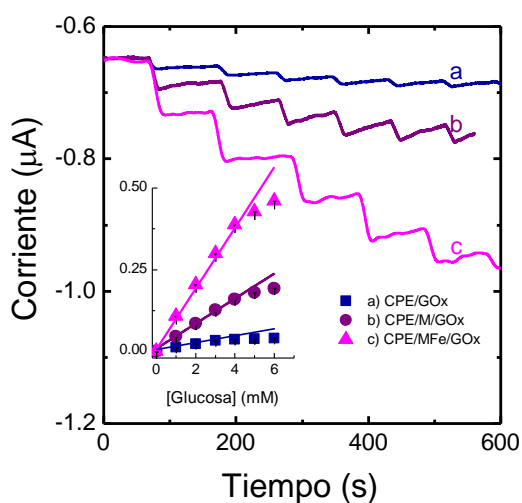


**Figura 6.7.** Diagramas de Nyquist obtenidos en  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  10 mM (KCl 0, 1 M) para **a)** CPE/GOx, **b)** CPE/M/GOx y **c)** CPE/MFe/GOx. **Inserto:** Circuito equivalente.

### 6.3.3. Rendimiento analítico y aplicaciones prácticas de CPE modificado con M, MFe y GOx

El  $H_2O_2$  es un producto que se genera durante el ciclo enzimático de las oxidoreductasas y, al utilizar las plataformas modificadas con material mesoporoso y GOx, se observó una reducción preferencial de este analito, por lo que se evaluó el uso

de estos biosensores para la determinación de la glucosa. La **Figura 6.8** ilustra las señales de corriente en función del tiempo y las curvas de calibración (**inserto Figura 6.8**), obtenidas para agregados sucesivos de glucosa 1 mM a -100 mV, utilizando a) CPE/GO<sub>x</sub>, b) CPE/M/GO<sub>x</sub> y c) CPE/MFe/GO<sub>x</sub>. Se observan perfiles amperométricos bien definidos con un tiempo de respuesta de ~13 s, similar a los obtenidos para la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los CPE sin GO<sub>x</sub>.



**Figura 6.8.** Cronoamperogramas y curvas de calibración para glucosa 1 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH 7 para: **a)** CPE/GO<sub>x</sub>, **b)** CPE/M/GO<sub>x</sub> y **c)** CPE/MFe/GO<sub>x</sub>. Potencial de trabajo: -100 mV.

Coincidentemente con los resultados discutidos anteriormente para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el valor de la pendiente de la curva de calibración, y por lo tanto mayor sensibilidad, fue CPE/MFe/GO<sub>x</sub> > CPE/M/GO<sub>x</sub> > CPE/GO<sub>x</sub>. Los parámetros analíticos obtenidos para cada uno de los biosensores se muestran en la **Tabla 6.3**.

**Tabla 6.3.** Parámetros analíticos para glucosa 1 mM en buffer fosfato 0,1 mM a pH 7, obtenidos de los cronoamperogramas utilizando CPE y CPE modificado con M y MFe y con GOx a -100 mV.

<b>Composición del electrodo</b>	<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{A M}^{-1}</math>)</b>	<b>Rango lineal (mM)</b>	<b>Límite de detección (mM)</b>
<b>a) CPE/GOx</b>	11,5±0,2	0,60-3,00	0,18
<b>b) CPE/M/GOx</b>	38,3±0,1	0,14-4,00	0,04
<b>c) CPE/MFe/GOx</b>	95,2±0,1	0,04-4,00	0,01

Además, en la **Tabla 6.4** se muestran los parámetros analíticos para la glucosa de diferentes sensores enzimáticos propuestos por otros autores en comparación con el biosensor propuesto en este trabajo. Los resultados demuestran que el biosensor CPE/MFe/GOx, posee competitivamente una muy buena sensibilidad analítica a -100 V y un límite de detección que es comparable o notablemente mejor que otros incluidos en dicha tabla.

**Tabla 6.4.** Parámetros analíticos de CPE/MFe/GOx para la detección de glucosa comparados con otros biosensores enzimáticos.

Composición del electrodo	Potencial (V)	Sensibilidad ( $\mu\text{A M}^{-1}$ )	Límite de detección (mM)	Rango lineal (mM)	Ref.
SPE <sup>a</sup> /M/GOx	-0,500	~330	0,04	10	(Z. Dai <i>et al.</i> , 2007)
GCE/MSN <sup>b</sup> -GOx/Nafion	-0,450	~1050	0,02	4,8	(Li <i>et al.</i> , 2013)
GCE/MCM-41-GOx/Nafion	+0,350	~1700	0,18	15,1	(Dai <i>et al.</i> , 2007)
Vulcan/CPE/GOx/Chitosan	+0,300	0.013	370	40	(Mutyala and Mathiyarasu, 2014)
CPE/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NP <sup>c</sup> /GOx	-0,100	85	0,3	16	(Comba <i>et al.</i> , 2010)
CPE/Fe NP <sup>d</sup> /GOx	-0,100	8,8	0,2	20	(Comba <i>et al.</i> , 2010)
CPE/Cu MP <sup>e</sup> /GOx	-0,100	~28	---	6	(Miscoria <i>et al.</i> , 2002)
CPE/Ir MP <sup>f</sup> /GOx	-0,100	~6,4	---	5	(Miscoria <i>et al.</i> , 2002)
CPE/MFe/GOx	-0,100	95	0,01	4	Este trabajo

<sup>a</sup>Electrodo screen-printed. <sup>b</sup>Nanoesferas de sílica mesoporosa. <sup>c</sup> Nanopartículas magnéticas. <sup>d</sup> Nanopartículas de hierro acicular.

<sup>e</sup>Micropartículas de cobre. <sup>f</sup>Micropartículas de iridium.

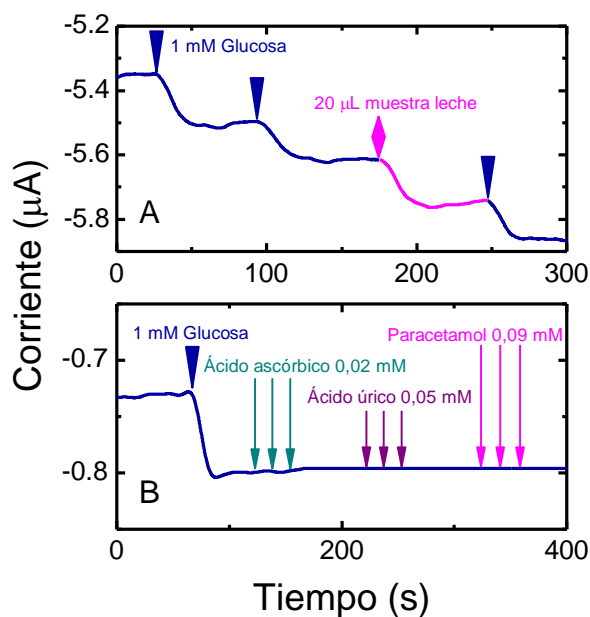
Otros parámetros analíticos relevantes en cuanto a las aplicaciones prácticas de detección son el número de ciclos enzimáticos y la estabilidad dependiente del tiempo. Dichos parámetros se evaluaron para el biosensor CPE/MFe/GOx, con el objetivo de determinar la sensibilidad de los análisis amperométricos hacia la detección de glucosa. Para determinar el número de ciclos de la GOx, se realizaron tres calibraciones sucesivas mediante cronoamperometría utilizando la misma superficie del electrodo

modificado con MFe y GOx, sin observarse cambios significativos. Para evaluar la estabilidad a largo plazo, se utilizó el mismo procedimiento durante un período de 21 días, almacenándose el bioelectrodo a 4 °C en una solución de buffer fosfato 0,1 M a pH 7 cuando no estaba en uso. En este caso tampoco se observaron cambios significativos y la sensibilidad disminuyó hasta un 89,7% con respecto a su valor original. Estos resultados indican que el microentorno en el que se encuentra la GOx provee una buena biocompatibilidad, conservando sus propiedades biocatalíticas. Además, la reproducibilidad para el mismo biocompósito y al menos tres superficies diferentes fue de 96%.

#### **6.3.4. Determinación de la concentración de glucosa en muestras de leche**

Para evaluar la aplicación práctica del (bio)electrodo diseñado, se determinó el contenido de glucosa en muestras de leche en polvo. La **Figura 6.9 A** muestra la respuesta de corriente registrada a -100 mV al agregar 20 µL de muestra en presencia de glucosa 2 mM y el posterior agregado de una alícuota de glucosa 1 mM en una celda conteniendo buffer fosfato 0,1 M a pH 7. El nivel de glucosa determinado mediante el método de adición estándar con CPE/MFe/GOx en tres muestras de leche en polvo (promedio de tres réplicas) fue de  $0,110 \pm 0,002$  mM. Estos resultados concuerdan con los determinados con el método espectrofotométrico estándar, obteniéndose un valor promedio de  $0,109 \pm 0,002$  mM, y con el informado en el envase de la muestra 0,110 mM.

Por otro lado, se evaluó la selectividad de este biosensor de glucosa, considerando posibles interferentes fácilmente oxidables comúnmente presentes en este tipo de matriz, como paracetamol y ácidos ascórbico y úrico. La **Figura 6.9 B** muestra la respuesta amperométrica a -100 mV registrada después de una adición de glucosa 1 mM seguida de tres adiciones sucesivas de ácido ascórbico 0,02 mM, de ácido úrico 0,05 mM y de paracetamol 0,09 mM. Ninguna de las sustancias analizadas presentó una respuesta electroquímica significativa en el biosensor.



**Figura 6.9.** Cronoamperograma para CPE/MFe/GOx en buffer fosfato 0,1 M de a pH 7 para (A) una alícuota de 20 µL de muestra en presencia de glucosa 2 mM y el posterior agregado de una alícuota de glucosa 1mM (B) una alícuota de glucosa 1 mM y alícuotas sucesivas de ácido ascórbico 0,02 mM, de ácido úrico 0,05 mM y de paracetamol 0, 09 mM.

De acuerdo con las características analíticas descritas de este (bio)sensor amperométrico simple y económico, se puede destacar que es una herramienta muy útil para la determinación de glucosa en muestras de alimentos y se podría extender su aplicabilidad al análisis farmacéutico y ambiental.

## 6.4. CONCLUSIONES

Se demostraron las ventajas de combinar las propiedades de dispersión de GOx con la notable eficiencia electrocatalítica de un material de sílice mesoporosa económico dopado con hierro para el desarrollo de un nuevo nanocompósito para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y glucosa. Hasta el momento no existen muchos trabajos utilizando MFe para desarrollar (bio)electrodos basados en oxidorreductasas.



Esta nueva estrategia permitió construir un sensor amperométrico robusto, reproducible, altamente sensible y selectivo, que se utilizó con éxito para determinar glucosa en muestras de leche. Además, el bajo costo y la simplicidad de preparación de estos biosensores electroquímicos los convierten en una alternativa interesante en el diseño de métodos de monitoreo para aplicaciones prácticas en varios campos.



# PARTE III

---

## CONCLUSIONES



# Capítulo 7

---

## Conclusiones generales

En la presente tesis se ha investigado la cuantificación de polifenoles, ácido ascórbico y glucosa en extractos vegetales mínimamente procesados y en leche. Para ello, se diseñaron y desarrollaron (bio)sensores aplicables a muestras de alimentos. Además, se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de las diferentes plataformas nanoestructuradas de sensado utilizando técnicas electroquímicas y espectroscópicas.

En una primera instancia se desarrolló un biosensor donde se inmovilizó la HRP en hidrogeles conteniendo laponita, nanopartículas de oro y un polímero catiónico ADN-bioinspirado.

Las estructuras formadas por estos hidrogeles demostraron ser compatibles para la conservación de la actividad enzimática de la HRP y permitieron el desarrollo de un bioelectrodo con características analíticas destacadas (alta sensibilidad, bajo límite de detección y estabilidad), permitiendo obtener biosensores que posibilitaron la cuantificación de polifenoles en muestras de alimentos. Este biosensor permitió la determinación de polifenoles en extractos de zanahorias y berenjenas mínimamente procesadas sometidas a diferentes tipos de corte y diferentes intensidades de radiación

UV-C, respectivamente. Los análisis efectuados en las diferentes muestras demostraron la ausencia de interferentes típicos.

Por otro lado, se diseñó un sensor utilizando nanotubos de carbono funcionalizados mediante tratamiento ácido, nanopartículas recubiertas por PDDA cargadas positivamente y un polímero aniónico ADN-bioinspirado.

Las matrices formadas exhibieron excelentes propiedades como consecuencia de las propiedades proporcionadas tanto por los nanotubos como por las nanopartículas de oro, así como un balance óptimo entre las interacciones electrostáticas, obteniéndose un sensor con notables características analíticas (alta sensibilidad, bajo límite de detección, estabilidad y un alto número de usos). Este sensor permitió la cuantificación de ácido ascórbico en extractos de berenjenas mínimamente procesadas sometidas a diferentes intensidades de radiación UV-C, sin la presencia de sustancias interferentes en el análisis.

Por último, se planteó el desarrollo, a modo exploratorio, de un (bio)sensor dual combinando las estrategias utilizadas para los dispositivos desarrollados anteriormente. Para ello, se trabajó con una pasta compuesta con polvo de grafito y materiales mesoporosos dopados con hierro, donde se incorporó la enzima GOx. Los (bio)electrodos formados exhibieron un ambiente óptimo para la biomolécula, permitiendo la conservación de su actividad enzimática. Este (bio)sensor permitió la cuantificación de glucosa en muestras de leche y su potencial aplicación a otras muestras de alimentos. Además, los resultados indicaron que la detección de glucosa se puede realizar sin la interferencia de otros componentes presentes en la muestra.

En resumen, se han estudiado las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento analítico de sistemas electroquímicos nanoestructurados de sensado de interés para la aplicación en la industria de los alimentos. Por su parte, los resultados mostraron que los diferentes tipos de estrés abiótico a los que son sometidos los vegetales, proporciona una herramienta útil para la conservación de estos alimentos, sin perder sus propiedades organolépticas y nutricionales.

Los resultados logrados en la presente tesis brindan un abanico de posibilidades frente a futuros estudios.

En primer lugar, es deseable el estudio de diferentes plataformas de sensado utilizando la inmensa variedad de materiales nanoestructurados disponibles en la actualidad, con el objetivo de diseñar y desarrollar (bio)sensores que posean propiedades analíticas óptimas y nos proporcionen una herramienta útil, rápida, sensible y menos costosa para el análisis y cuantificación de diferentes compuestos de interés para la industria alimentaria. Además, para el caso de los sensores expuestos en este trabajo para la cuantificación de polifenoles, ácido ascórbico y glucosa, se abre la posibilidad de utilizarlos en otras muestras de alimentos.

Por último, es deseable el estudio de los diferentes tipos de estrés abiótico y las condiciones en las que son aplicados a diferentes alimentos, con el objetivo de generar nuevas estrategias para mantener la frescura de los mismos conservando todas las propiedades deseables para el consumidor.





# PARTE **IV**

---

APÉNDICES



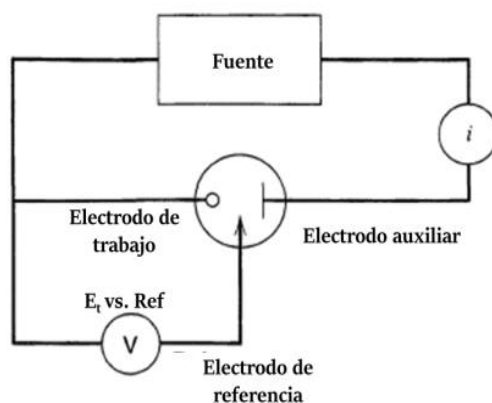
# Apéndice 1

---

## Técnicas experimentales

### 1.1. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Todas las medidas electroquímicas se realizaron en el Laboratorio de Electroquímica dependiente del INBIONATEC (CONICET-UNSE) y se llevaron a cabo con un potenciostato/galvanostato (Teq4, Buenos Aires, Argentina), equipado con un módulo analizador de impedancia. Para los experimentos se utilizó una celda electroquímica con un alambre de platino (Pt) como contraelectrodo, un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) como referencia y como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos de carbono vítreo (GCEs) y de pasta de grafito (CPEs) (**Figura 1.1**). Las medidas fueron llevadas a cabo mediante voltamperometría cíclica, cronoamperometría y espectroscopía de impedancia electroquímica las cuales se describen a continuación.



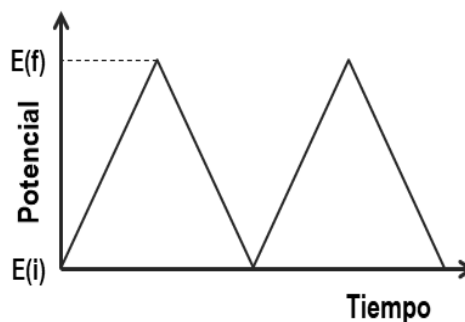
**Figura 1.1.** Esquema de una celda de tres electrodos.

### 1.1.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es la técnica más ampliamente utilizada para obtener información cualitativa acerca de reacciones electroquímicas. Puede brindar información considerable sobre la termodinámica y la cinética de procesos de oxidación y reducción en diferentes medios, procesos de adsorción sobre superficies, presencia de reacciones químicas previas o posteriores a la etapa de transferencia de carga y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos limpios o químicamente modificados (Bard *et al.*, 1944).

En esta técnica la variación en la intensidad de la corriente que tiene lugar en un electrodo colocado en una solución en ausencia de agitación magnética, está provocada por una señal de potencial de forma triangular, tal como la que se muestra en la **Figura 1.2**, en la que el potencial se barre linealmente desde un valor inicial  $E_i$  hasta alcanzar un valor final  $E_f$ , al cual se invierte la dirección del barrido de potencial. Este ciclo de perturbación se repite a menudo varias veces, por lo tanto la esta técnica posibilita también seguir la evolución en el tiempo del sistema en estudio. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman *potenciales de inversión o de conmutación*. El intervalo de potenciales elegido para un experimento dado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controlada de uno o más analitos. La dirección del barrido

inicial puede ser negativa o positiva, lo cual depende de la composición de la muestra (Pretcher, 1985).

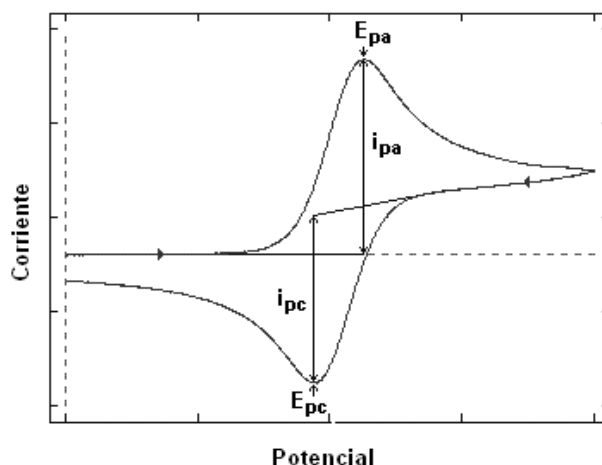


**Figura 1.2.** Señal de perturbación potencial-tiempo en experimentos de voltamperometría cíclica.

Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante. El gráfico resultante corriente-potencial es lo que se denomina voltamperograma cíclico. El voltamperograma cíclico es una función dependiente del tiempo, que involucra un gran número de parámetros físicos y químicos.

La **Figura 1.3** muestra la respuesta esperada para una cupla redox reversible (**R/O**) donde se encuentra involucrada la transferencia de un electrón. Las variables importantes en un voltamperograma cíclico son el potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), el potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), la corriente de pico anódica ( $i_{pa}$ ), y la corriente de pico catódica ( $i_{pc}$ ).

Suponiendo que inicialmente sólo está presente la especie reducida (**R**), se comienza el barrido de potencial a un valor donde no se observan procesos faradaicos. Como el valor del potencial inicial no es suficiente para producir la oxidación de la especie **R**, en este punto no se observan procesos faradaicos y únicamente existe una contribución de la corriente capacitiva. Cuando el potencial alcanza valores más positivos, se empieza a formar una corriente anódica debido a la oxidación de la especie **R** a la especie **O**.



**Figura 1.3.** Voltamperograma cíclico típico para un proceso redox reversible monoelectrónico.

A medida que el potencial aplicado se aproxima al potencial estándar ( $E^{\circ}$ ), tiene lugar un rápido aumento de la corriente a medida que la concentración superficial de  $R$  se hace cada vez menor, alcanzando un máximo. Esta corriente de pico,  $i_{pa}$ , se debe a dos componentes.

El primero, corresponde a la corriente inicial transitoria necesaria para ajustar la concentración superficial del reactivo a su concentración de equilibrio de acuerdo a la ecuación de Nernst (**Ecuación 1.1**); la cual disminuye rápidamente a medida que la capa de difusión se extiende más y más lejos de la superficie del electrodo.

$$E = E^0 + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

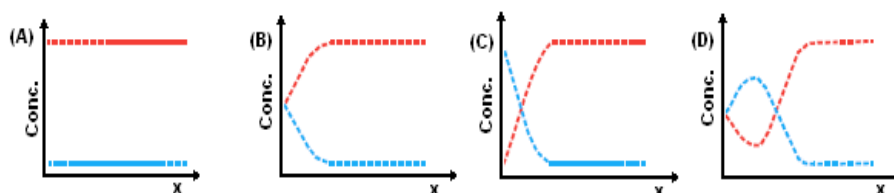
donde  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura,  $n$  es el número de electrones intercambiados por mol de especie electroactiva y  $F$  es la constante de Faraday.

El segundo, es la corriente controlada por difusión normal.

En el punto donde se invierte la dirección del barrido, la corriente continúa siendo anódica aun cuando el barrido se dirige a potenciales más negativos porque los

potenciales actuales son todavía lo suficientemente positivos para producir la oxidación de **R**. Una vez que el potencial se hace más negativo, la oxidación de **R** ya no ocurre con el paso del tiempo y la corriente cae a cero, entonces llega a ser catódica. La corriente catódica resulta de la reducción de **O** que se ha acumulado cerca de la superficie durante el barrido directo. Esta corriente catódica alcanza un máximo,  $i_{pc}$ , y después disminuye a medida que **O** acumulado se consume en la reacción catódica (Bard *et al.*, 1944).

El agotamiento de **R** y la acumulación de **O** cerca del electrodo se ilustra por medio de los perfiles de concentración-distancia en la **Figura 1.4**.



**Figura 1.4.** Perfiles de concentración de las especies reducida (en rojo) y oxidada (en azul) para una cupla redox a diferentes tiempos de electrólisis durante un experimento de voltamperometría cíclica donde (A) corresponde al potencial inicial, (B) y (D) al potencial formal de la cupla durante el barrido directo e inverso, respectivamente, y (C) al potencial necesario para agotar la concentración del reactante en la superficie del electrodo.

Un sistema reversible sin reacciones químicas o de adsorción acopladas del tipo  $O + ne \rightleftharpoons R$ , puede identificarse por voltamperometría cíclica midiendo la diferencia entre  $E_{pa}$  y  $E_{pc}$ , según la **Ecuación 1.2**:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} \text{ mV (a } 25^\circ\text{C)} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde  $E_{pa}$  y  $E_{pc}$ , medidos en mV, son los potenciales a los que tienen lugar los procesos anódico y catódicos, respectivamente. Esa separación de  $(59/n)$  mV, para  $\Delta E_p$ , es independiente de la velocidad de barrido de potencial para un par nernstiano

(reversible). Si bien  $\Delta E_p$  es ligeramente dependiente del potencial de inversión, siempre se aproxima a  $(59/n)$  mV. Asimismo cuando se lleva a cabo un ciclado repetido,  $\Delta E_p = (59/n)$  mV a 25 °C.

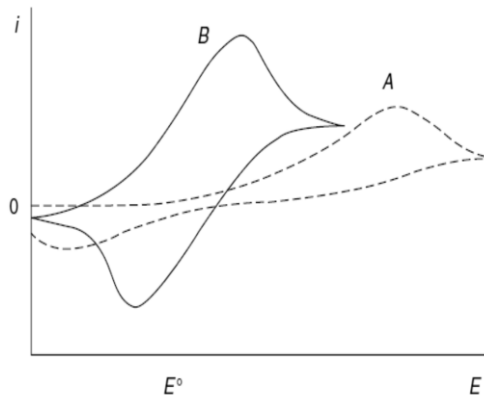
Por su parte, los valores de  $i_{pa}$  e  $i_{pc}$ , son iguales para un sistema reversible sin complicaciones cinéticas, es decir  $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$ . Esta relación es además independiente de la velocidad de barrido del potencial ( $v$ ), del potencial de inversión ( $E_f$ ) y de los coeficientes de difusión, y se verifica que  $i_p$  es directamente proporcional a  $v^{1/2}$ , de acuerdo a la **Ecuación 1.3** de Randles-Sevcik (Bard *et al.*, 1944):

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

donde  $i_p$  es la corriente pico,  $A$  es el área del electrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C$  es la concentración ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) y  $v$  es la velocidad de barrido ( $\text{V s}^{-1}$ ).

La desviación de la unidad de  $i_{pa}/i_{pc}$  es indicativa de complicaciones cinéticas o de otro tipo de proceso electroquímico. En el caso de sistemas irreversibles,  $\Delta E_p$  es mayor a  $(59/n)$  mV y depende de la velocidad de barrido del potencial. Se ha demostrado que para una velocidad de barrido dada, el  $\Delta E_p$  aumenta a medida que la constante de velocidad heterogénea del sistema disminuye. Aunque una reacción de transferencia de electrones podría parecer reversible a una velocidad de barrido baja, el aumento de dicha velocidad podría ocasionar el incremento de valores de  $\Delta E_p$ , un indicio seguro de irreversibilidad (**Figura 1.5**). Por tanto, para detectar una cinética de transferencia de electrones baja y obtener constantes de velocidad,  $\Delta E_p$  se debe medir para distintas velocidades de barrido.





**Figura 1.5.** Voltamperogramas cíclicos para una reacción (A) irreversible y (B) cuasi-reversible.

En caso de *sistemas cuasi-reversibles* la **Ecuación 1.3** se transforma en:

$$I_p = 0,4463 K(\Lambda\alpha)nFAC_A^*D^{1/2}\nu^{1/2} \left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia electrónica y los demás términos se mencionaron anteriormente.

En estos sistemas,  $i_p$  aumenta con  $\nu^{1/2}$  pero no es proporcional a ella. Además, el valor de  $\Delta E_p$  se aproxima a  $(60/n)$  mV a bajas velocidades de barrido, pero se incrementa al aumentar la velocidad de barrido. Mientras que para *sistemas irreversibles*, se obtiene la siguiente ecuación:

$$I_p = (2,99 \times 10^{-5})n(\alpha n_a)^{1/2}ACD^{1/2}\nu^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

donde  $\alpha_n$  es el número de electrones en la etapa determinante de la velocidad de reacción.

En esta clase de sistemas no se observa un potencial o una corriente de pico una vez que se invierte el potencial de barrido. Además,  $E_p$  es una función de la velocidad

de barrido. Aproximadamente, la variación de  $E_p$  es de  $(30/\alpha n)$  mV por cada 10 veces de aumento de la velocidad de barrido.

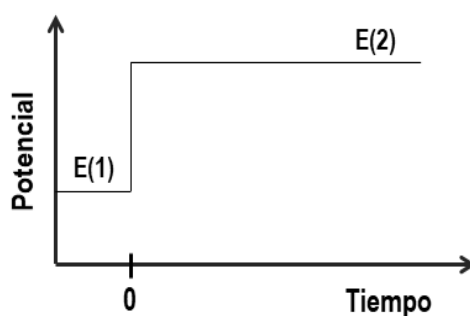
La voltamperometría cíclica se aplica principalmente como una herramienta para estudios básicos y diagnósticos que proporciona información cualitativa sobre procesos electroquímicos en diversas condiciones.

Algunas aplicaciones de las curvas i-E reversibles son:

- ✚ A partir de la altura de la onda se obtiene información acerca del número de electrones, del área del electrodo, del coeficiente de difusión del electrolito, de la concentración de especie electroactiva (bien por calibración o por adición de estándar), y la dimensión crítica del electrodo.
- ✚ A partir de la forma de la onda se obtiene información del número de electrones de la reacción redox (que es útil a su vez para el estudio de los mecanismos y cinéticas de los procesos de óxido/reducción), y de si el sistema es reversible. A menudo, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de óxido/reducción.
- ✚ A partir de la posición de la onda se pueden estimar los potenciales formales del sistema químico.

### 1.1.2. Cronoamperometría

La cronoamperometría implica la aplicación de un salto de potencial desde un valor  $E_1$ , al cual no ocurre ninguna reacción faradaica, a otro  $E_2$  lo suficientemente alto como para agotar la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo, en un lapso que, comparado con la escala de tiempo del experimento, puede considerarse instantáneo (**Figura 1.6**). A este potencial  $E_2$  se detecta una corriente faradaica como consecuencia de la reacción de transferencia de carga. El transporte de masa bajo estas condiciones es la etapa más lenta y las curvas corriente-tiempo reflejan los cambios en el gradiente de la concentración, en las proximidades de la superficie (Bard *et al.*, 1944).



**Figura 1.6.** Programa de potencial en función del tiempo en un experimento de cronoamperometría.

Para analizar la respuesta del sistema cuando se aplica una perturbación como la descrita, consideremos una reacción electroquímica simple, del tipo  $O + ne \rightleftharpoons R$ .

Supongamos, además, que tal reacción ocurre sin reacciones químicas acopladas, homogéneas o de adsorción, y bajo las siguientes condiciones iniciales y de contorno:

- ✚  $C_0(x, 0) = C_0(\infty)$  (a  $t = 0$  la concentración es uniforme a través del sistema y es igual a la concentración en el seno de la solución).
- ✚  $C_0(x, 0) = 0, t > 0$  (a tiempos mayores, la concentración superficial es cero).
- ✚  $C_0(x, 0) \rightarrow C_0(\infty), x \rightarrow \infty$  (la concentración se incrementa a medida que aumenta la distancia desde el electrodo).

La solución de las Leyes de Fick para estas condiciones (difusión lineal semi infinita, siempre que se trabaje con electrodos planos) resulta en un perfil de concentración dependiente del tiempo según la **Ecuación 1.6**:

$$C_0(x, t) = C_0(\infty) \left\{ 1 - \operatorname{erf} \left[ \frac{x}{(4D_0t)^{1/2}} \right] \right\} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Cuya derivada respecto de  $x$  resulta en el gradiente de concentración en la superficie del electrodo:

$$\left(\frac{\delta C}{\delta x}\right)_{x=0} = \frac{C_0(\infty)}{(\pi D_0 t)^{1/2}} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Por otro lado, la corriente es directamente proporcional al flujo ( $J$ ):

$$i = -nFAJ \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Siempre que el movimiento de las especies electroactivas se encuentre limitado por la difusión, de acuerdo a la primera ley de Fick, la velocidad de difusión (el flujo) es directamente proporcional a la pendiente del gradiente de concentración:

$$J(x, t) = -D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Combinando las **Ecuaciones 1.8** y **1.9** se obtiene una expresión general para la corriente:

$$i = nFA \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Sustituyendo la **Ecuación 1.10** en la **Ecuación 1.7** del gradiente de concentración obtenemos una expresión conocida como ecuación de Cottrell:

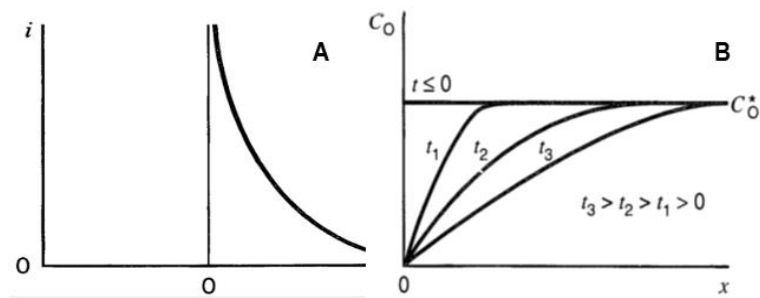
$$i = \frac{-nFD_0^{1/2}C_0(\infty)}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (\text{Ec. 1.11})$$

De esta forma el perfil de concentración es la dependencia de la concentración de la especie electroactiva con respecto a la distancia desde el electrodo. Estos perfiles cambian con el tiempo y muestran la relajación del sistema hacia el estado estacionario gracias al efecto de difusión, que tiende a minimizar la diferencia de concentración.

Si se supone que a distancias mayores o iguales a un valor crítico ( $\delta$ ), entre  $10^{-3}$  y  $10^{-1}$  cm, la  $C_o$  es igual a la del seno de la solución considerando que el gradiente de  $C_o$  es lineal, la corriente alcanzará un valor estacionario  $i_{est}$ , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{i_{est}}{nFA} = -D_0 \left( \frac{C_0(\infty) - C_0(0)}{\delta} \right) \quad (\text{Ec. 1.12})$$

donde  $\delta$  corresponde al espesor de la capa difusional. La **Figuras 1.7 A y B** muestran la variación de  $i$  vs.  $t$  y los perfiles de  $C_o$  a diferentes tiempos.



**Figura 1.7.** (A) Variación de la corriente con el tiempo en respuesta al potencial aplicado. (B) Perfiles de concentración resultantes, bajo condiciones de control difusional para un sistema electroquímico en el que  $O + ne \rightleftharpoons R$ .

Si disminuye  $\delta$ , la corriente estacionaria,  $i_{est}$ , puede aumentar y la convección se hace más intensa. Esta puede ser forzada por agitación mecánica de la solución, por diferencias de presión en un sistema de flujo continuo o por rotación del electrodo de trabajo (Zoski, 2007).

### **1.1.3. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)**

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, del inglés *electrochemical impedance spectroscopy*) es una excelente técnica que sirve para caracterizar las propiedades eléctricas de los materiales y sus interfaces, los cuales forman parte de un transductor electroquímico (Bard *et al.*, 1944). Se puede usar para investigar la dinámica de la carga unida o móvil en el seno o en las regiones interfaciales de cualquier tipo de material sólido o líquido: iónicos, semiconductores, electrónicos mixtos iónicos e incluso aislantes (dieléctricos). Además de la detección de procesos de biorreconocimiento, es una herramienta valiosa para caracterizar modificaciones de la superficie, como las que ocurren durante la inmovilización de biomoléculas en el transductor.

Los experimentos para evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos y/o los electrolitos se realizan generalmente utilizando celdas electroquímicas como las descritas al principio del presente apéndice. Para ello, un enfoque general es aplicar una perturbación eléctrica (un potencial o una corriente conocidos) a los electrodos y observar la respuesta (la corriente o el potencial resultantes), asumiendo que el sistema en estudio permanece en estado estacionario. Al aplicar una determinada perturbación, una multitud de procesos microscópicos tienen lugar en toda la celda y, en conjunto, conducen a la respuesta eléctrica general. Estos procesos incluyen el transporte de electrones a través de los conductores eléctricos, la transferencia de electrones en las interfaces electrodo-electrolito hacia o desde especies atómicas cargadas o no cargadas que se originan a partir de las reacciones en la celda y su entorno atmosférico (reacciones de oxidación o reducción), y el flujo de átomos cargados o aglomerados. Por lo tanto, la velocidad de flujo de las partículas cargadas (corriente) dependerá de la resistencia óhmica de los electrodos y del electrolito y de las velocidades de reacción en las interfaces electrodo-electrolito (Barsoukov and Macdonald, 2010).

Hay tres tipos diferentes de perturbación eléctrica que se utilizan en EIS, la más común y estándar es medir la impedancia total del sistema aplicando un potencial o una corriente de una determinada frecuencia, y midiendo el desplazamiento de fase y la amplitud, o las partes reales e imaginarias de la corriente resultante a esa frecuencia, utilizando un circuito analógico o un análisis de la respuesta con transformada de Fourier (FFT). En la actualidad, se encuentran disponibles una variedad de instrumentos comerciales que miden la impedancia en función de la frecuencia de manera automática y que se conectan fácilmente a las computadoras. Las ventajas al utilizar este tipo de estímulo eléctrico radican en la facilidad de uso, así como en el hecho de poder lograr una mejor relación de señal-ruido, permitiendo elegir el rango de frecuencia más adecuado para un experimento dado. Esta elección debe estar determinada por la naturaleza de las interfaces en el experimento y las constantes de tiempo asociadas con ellas.

Los parámetros derivados de un espectro EIS se dividen generalmente en dos categorías: (a) los pertinentes solo al material en sí, como la conductividad, la constante dieléctrica, las movilidades de las cargas, las concentraciones de equilibrio de las especies cargadas; y (b) los pertinentes a una interfaz electrodo-electrolito, como las constantes de velocidad y de tiempo, la capacitancia de la interface y el coeficiente de difusión de las especies (Barsoukov and Macdonald, 2010).

Por lo tanto, desde un punto de vista físico, la impedancia es la resistencia compleja total (medida en Ohms) que aparece cuando un estímulo es aplicado a un circuito, constituido por resistores, capacitores, inductores o cualquier combinación de éstos (Pretcher, 1985). Esta magnitud se representa con notación compleja, con:

- ✚ Una parte real atribuible a los elementos resistivos (en fase con el voltaje aplicado).
- ✚ Una parte imaginaria debida a la contribución de capacitores (desfasada del potencial aplicado en  $+45^\circ$ ), o de inductores (desfasadas del voltaje aplicado en  $-45^\circ$ ).

$$\mathbf{Z} = \mathbf{Z}' + j\mathbf{Z}'' = R - j\chi \quad (\text{Ec. 1.13})$$

$$\chi = \frac{1}{\omega C} \quad (\text{Ec. 1.14})$$

$$j = \sqrt{-1} \quad (\text{Ec. 1.15})$$

donde  $R$  es la resistencia (medida en  $\Omega$ ),  $\chi$  es la reactancia,  $C$  es la capacidad (medida en Faradios, F),  $\omega$  es la frecuencia angular aplicada (medida en rad/s).

Los datos de impedancia obtenidos experimentalmente para una celda electroquímica dada pueden analizarse utilizando un modelo matemático exacto basado en una teoría física plausible que predice la impedancia teórica o mediante un circuito equivalente relativamente empírico. En tales circuitos, una resistencia ideal describe una vía de conducción del sistema o la etapa de transferencia de carga, debida a una reacción electródica; mientras que una capacitancia, generalmente describe regiones espaciales de acumulación de carga dentro del sistema, tales como modificaciones en la superficie del electrodo debido a procesos de adsorción o a la formación de membranas poliméricas de relativamente menor conductividad.

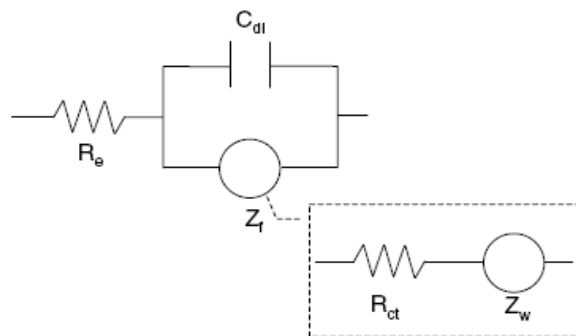
Una complicación importante que surge es que utilizar un ajuste mediante un circuito equivalente con elementos ideales suele ser inadecuado para describir la respuesta eléctrica, ya que las propiedades de un determinado sistema no son ideales. La desviación de la linealidad está dada por un gran número de defectos superficiales, zonas no homogéneas, especies adsorbidas, variaciones en la composición y estequiometría, porosidad, etc. Por lo tanto, a menudo se utilizan elementos de fase constante (CPE), lo que facilita enormemente el proceso de ajuste de los datos de impedancia observada para una determinada celda electroquímica (Barsoukov and Macdonald, 2010).

El circuito de Randles (**Figura 1.8**) es el circuito equivalente más simple que describe una celda electroquímica donde tiene lugar un proceso de transferencia electrónica en un solo paso, en presencia de difusión de los reactivos y/o los productos hacia la interface (Fernández-Sánchez *et al.*, 2005).



Combina tres componentes:

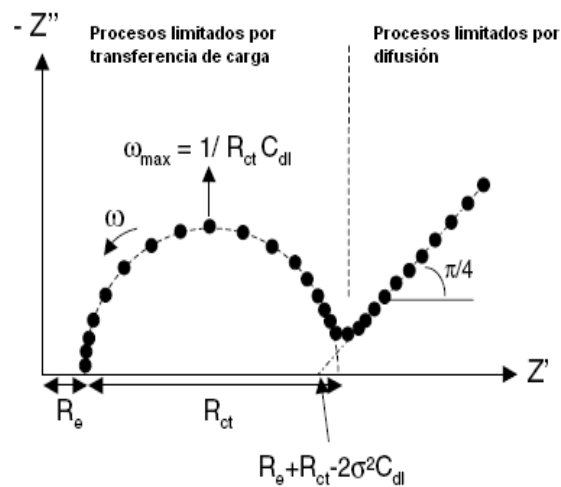
- ✚  $R_e$ : la resistencia del electrolito entre el electrodo de referencia y el de trabajo.
- ✚  $C_{dl}$ : la capacitancia de la doble capa.
- ✚  $Z_f$ : la impedancia faradaica debida al proceso de transferencia de carga, en la interfase electrodo de trabajo-electrolito, que normalmente se subdivide en:
  - ✓  $R_{ct}$ : resistencia debida a la transferencia de carga.
  - ✓  $Z_w$ : impedancia de Warburg, la cual refleja la influencia del transporte de masa de las especies electroactivas en la impedancia total.



**Figura 1.8.** Circuito equivalente de Randles.

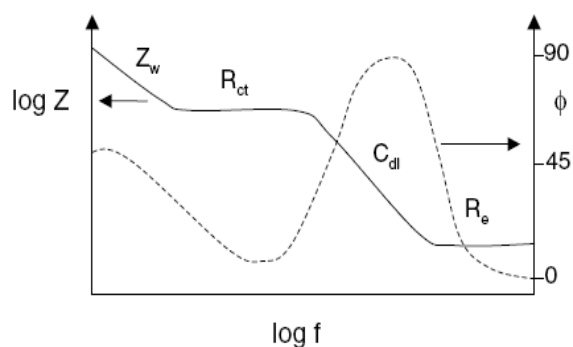
Para aquellos procesos controlados por difusión, predomina  $Z_w$ , mientras que para aquellos procesos controlados por la transferencia de carga,  $Z_f$  es solo  $R_{ct}$ . Todos estos componentes se pueden identificar estudiando la variación de la impedancia en una celda electroquímica, a lo largo de un determinado rango de frecuencias. Una forma muy común de presentar estos resultados es mediante un *plano complejo o diagrama de Nyquist*, en el cual se grafican la componente real de la impedancia ( $Z'$ ) en el eje  $x$  en función de la componente imaginaria ( $Z''$ ) de la impedancia en el eje  $y$  en el rango de frecuencia estudiado. En este tipo de gráfico (**Figura 1.9**) se pueden observar diferentes regiones: i) en la zona de frecuencias altas e intermedias un semicírculo capacitivo

conteniendo los componentes RC del sistema, el cual está relacionado con procesos controlados por la transferencia de carga y cuya intersección con el eje  $x$  permite obtener los valores de  $R_e$  y  $R_{ct}$ ; ii) en la zona de frecuencias bajas una línea recta de pendiente 1, se debe a  $Z_w$ , cuya extrapolación con el eje  $x$ , donde  $-Z''=0$  permite el cálculo del *coeficiente de Warburg*, a partir del cual se pueden estimar los coeficientes de difusión (Bard *et al.*, 1944).



**Figura 1.9.** Diagrama de Nyquist para un sistema electroquímico que involucra un proceso faradaico simple. Cada punto en el diagrama representa la impedancia a una frecuencia dada.

Otra forma de presentar los datos de impedancia es mediante un *Diagrama de Bode*, en el cual el logaritmo del valor absoluto de  $Z$  y la fase ( $\varphi$ ) se grafican vs. el logaritmo de la frecuencia ( $f$ ) (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10.** Diagrama de Bode para el mismo sistema representado en la Figura 1.9.

A diferencia del *diagrama de Nyquist*, este tipo de representación de los datos da información directa sobre  $f$  y  $\phi$ . Para aquellas regiones de frecuencia donde predomina un comportamiento resistivo, se observa una línea horizontal y  $\phi$  es cercano a  $0^\circ$ . En cambio, una región de frecuencias donde predomina un comportamiento capacitivo, se describe por una línea recta con pendiente  $-1$ , y  $\phi$  alrededor de  $90^\circ$ . Un fenómeno controlado por difusión se caracteriza por una línea recta de pendiente  $-1/2$  y  $\phi$  de  $45^\circ$  (Joseph Wang, 1948).

## 1.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

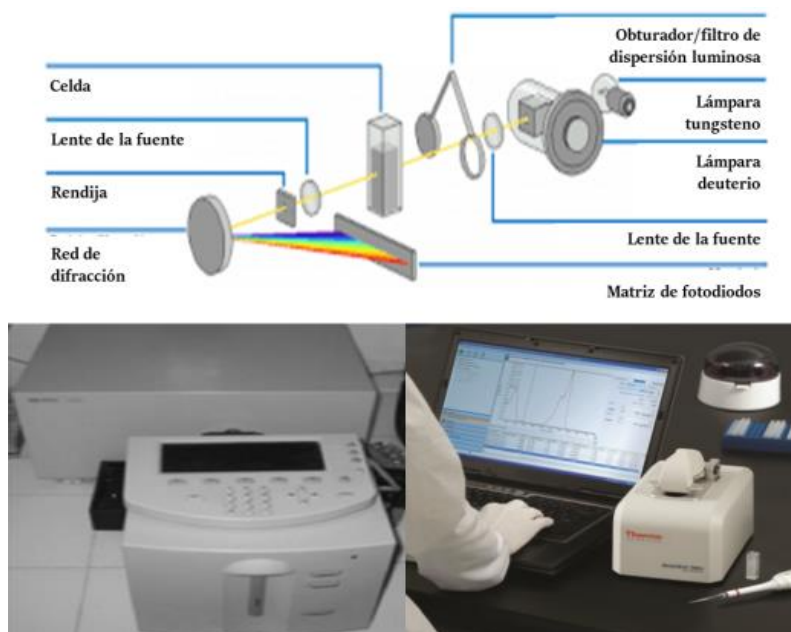
### 1.2.1. Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-Vis)

En el presente trabajo de tesis, los espectros de absorbancia UV-Vis fueron obtenidos, en diferentes oportunidades, con un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett- Packard HP 8453, con resolución de 1 nm entre 190 y 1100 nm, provisto con portacelda termostatizado y con espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) con resolución de 1 nm entre 190 y 840 nm. Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fotoquímica y el Laboratorio de Biología Molecular, dependientes del INBIONATEC (CONICET-UNSE).

La espectroscopía de absorción de luz UV-Vis es una de las técnicas más frecuentemente empleadas en el análisis químico. El esquema de un equipo de absorción UV-Vis se muestra en la **Figura 1.11**. La espectroscopía UV-Vis se basa en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra. La absorbancia,  $A$ , se define como la relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra,  $I_0$  y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra,  $I$ :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Ec. 1.16})$$

Esta absorción de la radiación varía con la longitud de onda de la radiación dependiendo de la composición química de la muestra y es directamente proporcional a su concentración. Un espectro de absorción UV-Vis no proporciona una clara identificación de un compuesto, pero es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos.



**Figura 1.11.** Esquema del diseño instrumental de un espectrofotómetro y fotografías de los espectrofotómetros utilizados.

## 1.2.2. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

En el presente trabajo de tesis, los espectros de infrarrojo para cada una de las muestras estudiadas fueron medidos con un equipo Jasco ATR-FT/IR-4600 (**Figura 1.12**) provisto de un detector de Sulfato de Triglicina deuterado dopado con L-alanina (DLATGS), y un divisor de haz de KBr. Todas las muestras se registraron usando un accesorio ATR de simple reflexión con un cristal de ZnSe que proporciona un alto rendimiento óptico. Las muestras fueron medidas con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y haciendo 32 barridos. Todos los espectros fueron registrados usando el software del equipo, mientras que el procesamiento de los espectros fue realizado usando Spectra Manager CFR, Jasco. Los experimentos de ATR-FTIR se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fotoquímica dependientes del INBIONATEC (CONICET-UNSE).

La espectroscopía infrarroja por transformada Fourier de (FTIR) proporciona información a nivel microscópico de subgrupos moleculares y su interacción con el agua, asimismo como de los tipos de agua ligados a la membrana. Los desplazamientos de frecuencias permiten inferir la exposición al agua de los principales grupos de hidratación: fosfato y carbonilo en la interfaz hidrocarburo agua y de las posibles diferencias de estructura que el agua puede adoptar en presencia de mezclas lipídicas y de la inserción de aminoácidos o péptidos. El análisis de las variaciones en las frecuencias de vibración correspondientes a los principales centros de hidratación, de la disposición y de la formación de enlaces hidrógeno permiten caracterizar los distintos estados de fases de lípidos puros y de mezclas. De esta manera, es posible obtener información acerca de la interacción entre grupos funcionales específicos de los lípidos con el agua y con el aminoácido en estudio de manera directa y en tiempo real.

Por otro lado ATR-FTIR (Reflectancia Total Atenuada) es una técnica de muestreo utilizada en el FTIR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el

cristal, registrándose el espectro de infrarrojo de la muestra en estudio. Los espectros obtenidos son similares pero no idénticos a los espectros de absorción ordinarios.

Los espectros de las muestras en solución acuosa se realizaron colocando una gota de las mismas sobre el cristal de ATR y dejando secar en condiciones adecuadas hasta la formación de un film hidratado, mientras que para las muestras sólidas, cantidades adecuadas fueron colocadas sobre la superficie del cristal.



**Figura 1.12.** Fotografías del equipo de ATR-FTIR.



# Apéndice 2

---

## Publicaciones

Algunos de los datos y figuras que se muestran en el presente trabajo de tesis son parte de las publicaciones que se listan a continuación.

### 2.1. TRABAJOS PUBLICADOS

Tulli, F., Gulotta, F. A., Martino, D. M., Paz Zanini, V. I., Borsarelli, C. D. (2018). “Ultrasensitive Amperometric Biosensing of Polyphenols Using Horseradish Peroxidase Immobilized in a Laponite/Au/DNA-Bioinspired Polycation Nanocomposite”. *Journal of The Electrochemical Society*, 165 (10) B452-B457. doi: 10.1149/2.1191810jes.



## **2.2. TRABAJOS EN PREPARACIÓN O ENVIADOS**

Tulli, F., Paz Zanini, V. I., Fernández, J. M., Martino, D. M., López de Mishima, B. A., Borsarelli, C. D. “Towards a highly selective and sensitive detection of ascorbic acid by sequential functionalization of a glassy carbon electrode with a nanocomposite film”. (Enviado)

Tulli, F., Cuello, N. I., Eimer, G. A., López de Mishima, B. A., Dalmasso, P. R., Paz Zanini, V. I. “*Novel Nanocomposite Based on Iron Mesoporous Silica (MCM-41/Fe) and Glucose Oxidase for Sensitive and Selective Amperometric sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Glucose*”. (En preparación)

## **2.3. TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES**

### **CIENTÍFICAS**

#### **2.3.1. Congresos**

Tulli, F., Cuello, N. I., Eimer, G. A., López de Mishima, B. A., Dalmasso, P. R., Paz Zanini, V. I. (2015). “Biosensor amperométrico de glucosa basado en electrodos de pasta de carbono modificados con glucosa oxidasa y materiales mesoporosos dopados con Fe”. *VIII Congreso de Química Analítica*. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-950-34-1279-4. (Póster)

Tulli, F., Gulotta, F. A., Martino, D. M., Paz Zanini, V. I., Borsarelli, C. D. (2016). “Bioelectrodo basado en la inmovilización de peroxidasa de rábano en películas ultradelgadas de polimerización biocompatible y nanopartículas de laponita y Au”. *XXXI Congreso Argentino de Química*. Buenos Aires, Argentina. ISSN: 1852-1207. (Póster)

Tulli, F., Dalmasso, P. R., López de Mishima, B. A., Paz Zanini, V. I. (2016). “Detección de ácido ascórbico en zanahoria y en hojas verdes mediante la utilización de un sensor amperométrico”. Fiorella Tulli, Pablo Dalmasso, Beatriz

López de Mishima, Verónica I. Paz Zanini. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Córdoba, Argentina. ISBN: 978-987-45380-0-0. (Póster)

Tulli, F., Gulotta, F. A., Gutiérrez, D., Rodríguez, S. C., López de Mishima, B. A. (2017). “Biochemical transduction mediated by an amperometric signal: horseradish peroxidase immobilized in a laponita/polymer hydrogel”. *Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias*. Buenos Aires, Argentina. ISSN: 1669-9106. (Póster)

### **2.3.2. Talleres y Seminarios**

Gulotta, F. A., Tulli, F., Martino, D. M., Paz Zanini, V. I., Borsarelli, C. D. (2017). “Desarrollo de un biosensor enzimático para la cuantificación de polifenoles en extractos de yerba mate”. *VI Jornada de Estudiantes y Jóvenes Profesionales Investigadores de la FAyA-UNSE*. (Póster)



- Adediran, S. A. and Lambeir, A. (1989) 'Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III', *European Journal of Biochemistry*, 186(3), pp. 571–576. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15246.x.
- Ahn, H. J., Kim, J. H., Kim, J. K., Kim, D. H., Yook, H. S. and Byun, M. W. (2005) 'Combined effects of irradiation and modified atmosphere packaging on minimally processed Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)', *Food Chemistry*, 89(4), pp. 589–597. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.029.
- Ahvenainen, R. (1996) 'New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables', *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, 7(6), pp. 179–187. doi: 10.1016/0924-2244(96)10022-4.
- Alonso Lomillo, M. A., Ruiz, J. G. and Muñoz Pascual, F. J. (2005) 'Biosensor based on platinum chips for glucose determination', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 547(2), pp. 209–214. doi: 10.1016/J.ACA.2005.05.037.
- Ambigaipalan, P. (2015) 'Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review', *Journal of Functional Foods*. Elsevier, 18, pp. 820–897. doi: 10.1016/J.JFF.2015.06.018.
- Anaissi, F. J., Demets, G. J.-F., Toma, H. E. and Coelho, A. C. . (1999) 'Modified electrodes based on mixed bentonite vanadium(V) oxide xerogels', *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 464(1), pp. 48–53. doi: 10.1016/S0022-0728(98)00465-3.
- Anastas, P. T. and Warner, J. C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press: London.
- Antoniadou, S., Jannakoudakis, A. D. and Theodoridou, E. (1989) 'Electrocatalytic reactions on carbon fibre electrodes modified by hemine I. Electroreduction of oxygen', *Synthetic Metals*, 30(3), pp. 283–294. doi: 10.1016/0379-6779(89)90651-6.
- Arroyo, M. (1998) 'Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones', *Ars Pharmaceutica*, pp. 1–17.
- Artés, F., Gómez, P., Aguayo, E., Escalona, V. and Artés-Hernández, F. (2009) 'Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities', *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), pp. 287–296. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.10.003.

- B., B. G. (1992) *Cyclopolymerization and cyclocopolymerization*. Marcel Dekker, New York.
- Babic, I., Amiot, M. J., Nguyen, C. and Aubert, S. (1993) 'Changes in Phenolic Content in Fresh Ready-to-use Shredded Carrots during Storage', *Journal of Food Science*, 58(2), pp. 351–356. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb04273.x.
- Bahr, J. L., Yang, J., Kosynkin, D. V., Bronikowski, M. J., Smalley, R. E. and Tour, J. M. (2001) 'Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: A bucky paper electrode', *Journal of the American Chemical Society*, 123(27), pp. 6536–6542. doi: 10.1021/ja010462s.
- Bajaj, K. L. and Kaur, G. (1981) 'Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits.', *The Analyst*, 106(1258), pp. 117–120.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P. and Menon, V. P. (2004) 'Ferulic Acid Alleviates Lipid Peroxidation in Diabetic Rats', *Phytotherapy Research*, 18(4), pp. 310–314. doi: 10.1002/ptr.1440.
- Balasubramanian, K. and Burghard, M. (2005) 'Chemically functionalized carbon nanotubes', *Small*, 1(2), pp. 180–192. doi: 10.1002/sml.200400118.
- Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (no date) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., York, N., @bullet, C., Brisbane, W. and Toronto, S. E. (1944) *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications, Electrochemistry. I. Faulkner, Larry R.* doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00056-9.
- Barry-Ryan, C. and O'Beirne, D. (1998) 'Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method', *Journal of Food Science*, 63(5), pp. 851–856. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb17913.x.
- Barry-Ryan, C. and O'Beirne, D. (2000) 'Effects of peeling methods on the quality of ready-to-use carrot slices', *International Journal of Food Science and Technology*, 35(2), pp. 243–254. doi: 10.1046/j.1365-2621.2000.00335.x.
- Barsoukov, E. and Macdonald, R. (2010) *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications, America*.
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W., McCullen, S. B., Higgins, J. B. and Schlenker, J. L. (1992) 'A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates', *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), pp. 10834–10843. doi: 10.1021/ja00053a020.

- Belloni, J. (1996) 'Metal nanocolloids', *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. Elsevier, 1(2), pp. 184–196. doi: 10.1016/S1359-0294(96)80003-3.
- Bengoa, J. F., Cagnoli, M. V., Gallegos, N. G., Alvarez, A. M., Moggi, L. V., Moreno, M. S. and Marchetti, S. G. (2005) 'Iron oxide nanoparticles inside the MCM-41 channels: Study of the structural stability of the support', *Microporous and Mesoporous Materials*, 84(1–3), pp. 153–160. doi: 10.1016/j.micromeso.2005.05.018.
- Besombes, J.-L., Cosnier, S., Labbé, P. and Reverdy, G. (1995) 'Improvement of the analytical characteristics of an enzyme electrode for free and total cholesterol via laponite clay additives', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 317(1–3), pp. 275–280. doi: 10.1016/0003-2670(95)00392-4.
- Bhagavan, N. V. (2011) *Medical Biochemistry*,. 4th Editio. Amsterdan.
- Bharathi, S., Nogami, M. and Ikeda, S. (2001) 'Novel electrochemical interfaces with a tunable kinetic barrier by self-assembling organically modified silica gel and gold nanoparticles', *Langmuir*, 17(1), pp. 1–4. doi: 10.1021/la0010572.
- Bianchini, J. R., Saito, K., Balin, T. B., Dua, V. and Warner, J. C. (2007) 'Thymine-based, water-soluble phototerpolymers: Their preparation and synthesis', *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 45(7), pp. 1296–1303. doi: 10.1002/pola.21901.
- Bolin, H. R. and Huxsoll, C. C. (1991) 'Effect of Preparation Procedures and Storage Parameters on Quality Retention of Salad-cut Lettuce', *Journal of Food Science*, 56(1), pp. 60–62. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb07975.x.
- Bose, S., Khare, R. A. and Moldenaers, P. (2010) 'Assessing the strengths and weaknesses of various types of pre-treatments of carbon nanotubes on the properties of polymer/carbon nanotubes composites: A critical review', *Polymer*. Elsevier Ltd, 51(5), pp. 975–993. doi: 10.1016/j.polymer.2010.01.044.
- Boyer, R. (2000) *Conceptos de Bioquímica*. New York: International Thomson Editores.
- Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D. and Scollary, G. R. (2011) 'Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), pp. 479–498. doi: 10.1080/10408391003690559.
- Braun, D. and Collin, G. (2010) '100 Jahre bakelit', *Chemie in Unserer Zeit*, 44(3), pp. 190–197. doi: 10.1002/ciuz.201000514.
- Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K. and Franzen, S. (2005) 'Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces', *Langmuir*, 21(20), pp. 9303–9307. doi:

10.1021/la050588t.

- Buchholz, K. and Klein, J. (1987) 'Characterization of immobilized biocatalysts', *Methods in Enzymology*. Academic Press, 135, pp. 3–30. doi: 10.1016/0076-6879(87)35062-1.
- Burns, D. T., Danzer, K. and Townshend, A. (2002) 'Commission on general aspects of analytical chemistry. Use of the terms "Recovery" and "Apparent recovery" in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002)', *Pure and Applied Chemistry*, 74(11), pp. 2201–2205.
- Butler, B., Angelo, J., Florida, O. F. and Angelo, J. (1956) 'Preparation and Polymerization of Unsaturated Quaternary Ammonium Compounds. VIII. A Proposed Alternating Intramolecular-Intermolecular Chain Propagation'', 1030(1), pp. 1–4.
- Cannon, A. S. J., Raudys, A., Undurti and Warner, J. C. (2004) 'WO 2004058187'.
- Cano, L. A., Bengoa, J. F., Stewart, S. J., Mercader, R. C. and Marchetti, S. G. (2009) 'Synthesis of hematite nanowires using a mesoporous hard template', *Hyperfine Interactions*, 195(1), pp. 93–98. doi: 10.1007/s10751-009-0106-6.
- Cantos, E., Espín, J. C. and Tomás-Barberán, F. A. (2001) 'Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), pp. 322–330. doi: 10.1021/jf000644q.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. L. (1996) 'Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), pp. 3426–3431. doi: 10.1021/jf9602535.
- Carrero, H. and E. León, L. (2001) 'Electrochemically active films of negatively charged molecules, surfactant and synthetic clays', *Electrochemistry Communications*. Elsevier, 3(8), pp. 417–420. doi: 10.1016/S1388-2481(01)00191-6.
- Casis, N., Luciani, C. V., Vich Berlanga, J., Estenoz, D. A., Martino, D. M. and Meira, G. R. (2007) 'Synthesis of "bioinspired" copolymers: Experimental and theoretical investigation on poly(vinyl benzyl thymine-co-triethyl ammonium chloride)', *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1(1), pp. 65–72. doi: 10.1080/17518250701757007.
- Cathcart, R. F. (1991) 'A unique function for ascorbate', *Medical Hypotheses*, 35(1), pp. 32–37. doi: 10.1016/0306-9877(91)90080-I.
- Chaplin, M. and Bucke, C. (2000) *Enzyme Technology*. Edición Electrónica Cambridge University Press.
- Chaubey, A. and Malhotra, B. D. (2002) 'Mediated biosensors', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 17(6–

7), pp. 441–456. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00313-X.

Chen, H., Wang, Y., Wang, Y., Dong, S. and Wang, E. (2006) ‘One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles’, 47, pp. 763–766. doi: 10.1016/j.polymer.2005.11.034.

Chen, J., Hamon, M. A., Hu, H., Chen, Y., Rao, A. M., Eklund, P. C. and Haddon, R. C. (1998) ‘Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes’, 282(October), pp. 95–99. doi: 10.1126/science.282.5386.95.

Chen, S. (1999) ‘4-Hydroxythiophenol-protected gold nanoclusters in aqueous media’, *Langmuir*, 15(22), pp. 7551–7557. doi: 10.1021/la990398g.

Chen, X., Wu, G., Cai, Z., Oyama, M. and Chen, X. (2014) ‘Advances in enzyme-free electrochemical sensors for hydrogen peroxide, glucose, and uric acid’, *Microchimica Acta*, 181(7–8), pp. 689–705. doi: 10.1007/s00604-013-1098-0.

Cheng, C. M., Egbe, M. I., Grasshoff, J. M., Guarrera, D. J., Pai, R. P., Warner, J. C. and Taylor, L. D. (1995) ‘Synthesis of 1-(Vinylbenzyl)thymine, A Novel, Versatile Multi-Functional Monomer’, pp. 2515–2519.

Cisneros-Zevallos, L. (2003) ‘The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value’, *Journal of Food Science*, 68(5), pp. 1560–1565. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb12291.x.

Coche-Guérente, L., Desprez, V. and Labbé, P. (1998) ‘Characterization of organosilasesquioxane-intercalated-laponite-clay modified electrodes and (bio)electrochemical applications’, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 458(1–2), pp. 73–86. doi: 10.1016/S0022-0728(98)00342-8.

Comba, F. N., Gutierrez, F., Herrasti, P., Rubianes, M. D. and Rivas, G. A. (2012) ‘Effect of the Incorporation of Proteins on the Performance of Carbon Paste Electrodes Modified with Electrogenerated Magnetite Nanoparticles towards the Reduction of Hydrogen Peroxide’, *Electroanalysis*, 24(7), pp. 1541–1546. doi: 10.1002/elan.201200176.

Comba, F. N., Rubianes, M. D., Cabrera, L., Gutiérrez, S., Herrasti, P. and Rivas, G. A. (2010) ‘Highly Sensitive and selective glucose biosensing at carbon paste electrodes modified with electrogenerated magnetite nanoparticles and glucose oxidase’, *Electroanalysis*, 22(14), pp. 1566–1572. doi: 10.1002/elan.200900566.

Corbo, M. R., Speranza, B., Campaniello, D., D’Amato, D. and Sinigaglia, M. (2010) ‘Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies’, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (September 2015), pp. 1143–1154.



- Cosnier, S., Lambert, F. and Stoytcheva, M. (2000) 'A composite clay glucose biosensor based on an electrically connected HRP', *Electroanalysis*, 12(5), pp. 356–360. doi: 10.1002/(SICI)1521-4109(20000301)12:5<356::AID-ELAN356>3.0.CO;2-Z.
- Cosnier, S., Mousty, C., Gondran, C. and Lepellec, A. (2006) 'Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: Comparative study', *Materials Science and Engineering: C*. Elsevier, 26(2–3), pp. 442–447. doi: 10.1016/J.MSEC.2005.10.077.
- Croce, F., Appetecchi, G. B., Persi, L. and Scrosati, B. (1998) 'Nanocomposite polymer electrolytes for lithium batteries', *Nature*, 394(6692), pp. 456–458. doi: 10.1038/28818.
- Csöregi, E., Jönsson-Pettersson, G. and Gorton, L. (1993) 'Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases', *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 30(3), pp. 315–337. doi: 10.1016/0168-1656(93)90147-F.
- Cuello, N. I., Elías, V. R., Rodríguez Torres, C. E., Crivello, M. E., Oliva, M. I. and Eimer, G. A. (2015) 'Development of iron modified MCM-41 as promising nano-composites with specific magnetic behavior', *Microporous and Mesoporous Materials*. Elsevier Inc., 203(C), pp. 106–115. doi: 10.1016/j.micromeso.2014.10.005.
- Curtis, H. and Barnes, N. S. (2000) *Biología 6ta edición*. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Sao Pablo: Editorial Médica Panamericana.
- Dahman, Y., Puskas, J. E., Margaritis, A., Merali, Z. and Cunningham, M. (2003) 'Novel thymine-functionalized polystyrenes for applications in biotechnology. Polymer synthesis and characterization', *Macromolecules*, 36(7), pp. 2198–2205. doi: 10.1021/ma021608q.
- Dai, Z., Fang, M., Bao, J., Wang, H. and Lu, T. (2007) 'An amperometric glucose biosensor constructed by immobilizing glucose oxidase on titanium-containing mesoporous composite material of no. 41 modified screen-printed electrodes', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 591(2), pp. 195–199. doi: 10.1016/J.ACA.2007.03.063.
- Dai, Z. H., Ni, J., Huang, X. H., Lu, G. F. and Bao, J. C. (2007) 'Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on a hexagonal mesoporous silica-MCM-41 matrix', *Bioelectrochemistry*. Elsevier, 70(2), pp. 250–256. doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2006.09.009.
- Daniel, M. C. M. and Astruc, D. (2004) 'Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology', *Chemical Reviews*, 104, pp. 293–346. doi: 10.1021/cr030698.
- Decher, G. (1997) 'Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites', *Science*, 277(5330), pp.

1232–1237. doi: 10.1126/science.277.5330.1232.

Dey, R. S., Bera, R. K. and Raj, C. R. (2013) ‘Nanomaterial-based functional scaffolds for amperometric sensing of bioanalytes’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(11), pp. 3431–3448. doi: 10.1007/s00216-012-6606-2.

Dryhurst, G., Kadish, K. M., Scheller, F. and Renneberg, R. (1982) ‘Ascorbic Acid’, in *Biological Electrochemistry*, pp. 256–278. doi: 10.1016/B978-0-12-222401-0.50008-1.

Dursun, Z. and Gelmez, B. (2010) ‘Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid at Pt nanoparticles decorated multiwall carbon nanotubes modified GCE’, *Electroanalysis*, 22(10), pp. 1106–1114. doi: 10.1002/elan.200900525.

Eggins, B. R. (1997) *Biosensors: An Introduction*.

Eisenstadt, M. A. and Bogolitsyn, K. G. (2010) ‘Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds’, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 36(7), pp. 802–815. doi: 10.1134/s1068162010070034.

‘Electrocatalytic Determination of Ascorbic Acid on a Glassy Pentacyanonitrosylferrate’ (2005) *Analytical Chemistry*, 21(June), pp. 689–692.

Elyacoubi, A., Zayed, S. I. M., Blankert, B. and Kauffmann, J. M. (2006) ‘Development of an amperometric enzymatic biosensor based on gold modified magnetic nanoporous microparticles’, *Electroanalysis*, 18(4), pp. 345–350. doi: 10.1002/elan.200503418.

Erdurak-Kiliç, C. S., Uslu, B., Dogan, B., Ozgen, U., Ozkan, S. A. and Coskun, M. (2006) ‘Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey’, *Journal of Analytical Chemistry*, 61(11), pp. 1113–1120. doi: 10.1134/S106193480611013X.

Eremia, S. A. V., Vasilescu, I., Radoi, A., Litescu, S.-C. and Radu, G.-L. (2013) ‘Disposable biosensor based on platinum nanoparticles-reduced graphene oxide-laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content’, *Talanta*. Elsevier, 110, pp. 164–170. doi: 10.1016/J.TALANTA.2013.02.029.

Escobar Hernández, A. (2013) *Aplicación de la tecnología de barreras para la conservación individual y de mezclas de hortalizas minimamente procesadas*. Universidad Nacional de Colombia.

Faguy, P. W., Ma, W., Lowe, J. A., Panb, W., Brownb, T. and Green, B. (1994) ‘Conducting Polymer-Clay Composites for Electrochemical Applications’, 4(5), pp. 771–772.

Falaras, P., Lezou, F., Pomonis, P. and Ladavos, A. (2000) ‘Al-pillared acid-activated montmorillonite modified

- electrodes', *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 486(2), pp. 156–165. doi: 10.1016/S0022-0728(00)00133-9.
- Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y. and Cosnier, S. (2007a) 'Amperometric phenol biosensor based on laponite clay–chitosan nanocomposite matrix', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 22(6), pp. 816–821. doi: 10.1016/J.BIOS.2006.03.002.
- Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y. and Cosnier, S. (2007b) 'Amperometric phenol biosensor based on laponite clay – chitosan nanocomposite matrix', 22, pp. 816–821. doi: 10.1016/j.bios.2006.03.002.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M. and Lafay, S. (2008) 'Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans', *Journal of Nutrition*, 138(12), pp. 2309–2315. doi: 10.3945/jn.108.095554.
- Ferapontova, E. E., Grigorenko, V. G., Egorov, A. M., Börchers, T., Ruzgas, T. and Gorton, L. (2001) 'Mediatorless biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 16(3), pp. 147–157. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00134-8.
- Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J. and Rawson, K. (2005) 'Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: Application to biosensor development', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 37–48. doi: 10.1016/j.trac.2004.08.010.
- Fox, B. A. and Cameron, A. G. (1989) *Food Science, Nutrition and Health*. 5th Editio. Edited by E. Arnold. London, UK.
- Fred Hoover, M. (1970) 'Cationic Quaternary Polyelectrolytes A Literature Review', *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, 4(6), pp. 1327–1418. doi: 10.1080/00222337008081733.
- Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D. and Kubota, L. T. (2003) 'Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity', *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Brazilian Chemical Society, 14(2), pp. 230–243. doi: 10.1590/S0103-50532003000200008.
- Fujigaya, T. and Nakashima, N. (2015) 'Non-covalent polymer wrapping of carbon nanotubes and the role of wrapped polymers as functional dispersants', *Science and Technology of Advanced Materials*. IOP Publishing, 16(2), p. 024802. doi: 10.1088/1468-6996/16/2/024802.
- Gervasini, A., Messi, C., Carniti, P., Ponti, A., Ravasio, N. and Zaccheria, F. (2009) 'Insight into the properties of Fe oxide present in high concentrations on mesoporous silica', *Journal of Catalysis*. Elsevier Inc., 262(2), pp. 224–234. doi: 10.1016/j.jcat.2008.12.016.

- El Gharras, H. (2009) 'Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review', *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), pp. 2512–2518. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x.
- González-Aguilar, G. A., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., de la Rosa, L. A. and Álvarez-Parrilla, E. (2010) 'Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies', *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), pp. 65–72. doi: 10.1007/s00003-009-0315-6.
- González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A. and Ayala-Zavala, J. F. (2007) 'Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C', *Journal of Food Science*, 72(3), pp. 197–202. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00295.x.
- Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F. D., Ruzgas, T. and Gazaryan, I. (1999) 'Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 400(1–3), pp. 91–108. doi: 10.1016/S0003-2670(99)00610-8.
- Guerzoni, M. E., Gianotti, A., Corbo, M. R. and Sinigaglia, M. (1996) 'Shelf-life modelling for fresh-cut vegetables', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 9(2), pp. 195–207. doi: 10.1016/S0925-5214(96)00048-8.
- Guilbault, G. G. and Lubrano, G. J. (1973) 'An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 64(3), pp. 439–455. doi: 10.1016/S0003-2670(01)82476-4.
- Guo, L., Yang, S., Yang, C., Yu, P., Wang, J., Ge, W. and Wong, G. K. L. (2000) 'Synthesis and characterization of poly(vinylpyrrolidone)-modified zinc oxide nanoparticles', *Chemistry of Materials*, 12(8), pp. 2268–2274. doi: 10.1021/cm9907817.
- Gutiérrez, D. R., Chaves, A. R. and Rodríguez, S. del C. (2018a) 'UV-C and ozone treatment influences on the antioxidant capacity and antioxidant system of minimally processed rocket (*Eruca sativa* Mill.)', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 138(December 2017), pp. 107–113. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.12.014.
- Gutiérrez, D. R. and Rodríguez, S. C. (2017) 'Combined Effect of UV-C and Modified Atmosphere Packaging for Keeping Antioxidant Compounds and Extend to Shelf-Life of Fresh-Cut Rocket Leaves', (6), pp. 62–68.
- Hasanzadeh, M., Shadjou, N., de la Guardia, M., Eskandani, M. and Sheikhzadeh, P. (2012) 'Mesoporous silica-based materials for use in biosensors', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier, 33, pp. 117–129. doi: 10.1016/J.TRAC.2011.10.011.
- Hasanzadeh, M., Shadjou, N. and Omidinia, E. (2013) 'Mesoporous silica (MCM-41)-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a novel magnetic nanosensor for determination of trace amounts of amino acids', *Colloids and Surfaces B*:

*Biointerfaces*. Elsevier, 108, pp. 52–59. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2013.02.015.

- Hayat, A., Catanante, G. and Marty, J. L. (2014) ‘Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors’, *Sensors (Switzerland)*, 14(12), pp. 23439–23461. doi: 10.3390/s141223439.
- Ho, K. Y., McKay, G. and Yeung, K. L. (2003) ‘Selective adsorbents from ordered mesoporous silica’, *Langmuir*, 19(7), pp. 3019–3024. doi: 10.1021/la0267084.
- Howard, L. R. and Griffin, L. E. (1993) ‘Lignin Formation and Surface Discoloration of Minimally Processed Carrot Sticks’, *Journal of Food Science*, 58(5), pp. 1065–1067. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb06113.x.
- Hu, I. F. and Kuwana, T. (1986) ‘Oxidative Mechanism of Ascorbic Acid at Glassy Carbon Electrodes’, *Analytical Chemistry*, 58(14), pp. 3235–3239. doi: 10.1021/ac00127a069.
- Huynh, W. U., Peng, X. and Alivisatos, A. P. (1999) ‘CdSe nanocrystal rods/poly(3-hexylthiophene) composite photovoltaic devices’, *Advanced Materials*, 11(11), pp. 923–927. doi: 10.1002/(SICI)1521-4095(199908)11:11<923::AID-ADMA923>3.0.CO;2-T.
- Ignat, I., Volf, I. and Popa, V. I. (2011) ‘A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables’, *Food Chemistry*. Elsevier, 126(4), pp. 1821–1835. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2010.12.026.
- Iveković, D., Milardović, S. . and Grabarić, B. S. (2004) ‘Palladium hexacyanoferrate hydrogel as a novel and simple enzyme immobilization matrix for amperometric biosensors’, *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 20(4), pp. 872–878. doi: 10.1016/J.BIOS.2004.04.001.
- J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, E. W. S. (1994) ‘Effect of Surfactant / Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves : Inorganic’, *Chemistry of Materials*, 6, pp. 2317–2326. doi: 10.1021/cm00048a018.
- Jacobo-Velázquez, D. A., Martínez-Hernández, G. B., Del C. Rodríguez, S., Cao, C. M. and Cisneros-Zevallos, L. (2011) ‘Plants as biofactories: Physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), pp. 6583–6593. doi: 10.1021/jf2006529.
- Jacobs, C. B., Peairs, M. J. and Venton, B. J. (2010) ‘Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules’, *Analytica Chimica Acta*, 662(2), pp. 105–127. doi: 10.1016/j.aca.2010.01.009.
- Jadon, N., Jain, R., Sharma, S. and Singh, K. (2016) ‘Recent trends in electrochemical sensors for multianalyte detection – A review’, *Talanta*. Elsevier, 161, pp. 894–916. doi: 10.1016/J.TALANTA.2016.08.084.

- Jäger, W., Gohlke, U., Hahn, M., Wandrey, C. and Dietrich, K. (1989) 'Synthese und Anwendung von Flockungsmitteln', *Acta Polymerica*, 40(3), p. 9. doi: 10.1002/actp.1989.010400303.
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2007) 'Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems', *Plasmonics*, 2(3), pp. 107–118. doi: 10.1007/s11468-007-9031-1.
- Jenkins, A. D.; Kratochvíl, P.; Stepto, R. F. T.; Suter, U. W. (1996) 'International Union of Pure Glossary of Basic Terms in Polymer', *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), pp. 2287–2311. doi: 10.1351/pac199668122287.
- Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z. and Dong, S. (2002) 'A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network', *Analytical Chemistry*, 74(9), pp. 2217–2223. doi: 10.1021/ac011116w.
- Jiang, L., Gao, L. and Sun, J. (2003) 'Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes', *Journal of Colloid and Interface Science*, 260(1), pp. 89–94. doi: 10.1016/S0021-9797(02)00176-5.
- Joseph Wang (1948) *Analytical Electrochemistry*. Third Edit. Ney Jersey: John Wiley & Sons.
- Kampfenkel, K., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1994) 'Extraction and Determination of Ascorbate and Dehydroascorbate from plant tissue'. Francia.
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A. and Butterfield, D. A. (2002) 'Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies', *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier, 13(5), pp. 273–281. doi: 10.1016/S0955-2863(01)00215-7.
- Karim, F. and Fakhruddin, A. N. M. (2012) 'Recent advances in the development of biosensor for phenol: A review', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11(3), pp. 261–274. doi: 10.1007/s11157-012-9268-9.
- Karimi-Maleh, H., Moazampour, M., Yoosefian, M., Sanati, A. L., Tahernejad-Javazmi, F. and Mahani, M. (2014) 'An Electrochemical Nanosensor for Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Sudan I in Food Samples', *Food Analytical Methods*, 7(10), pp. 2169–2176. doi: 10.1007/s12161-014-9867-x.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. (2001) 'Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health', *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), pp. 703–725. doi: 10.1046/j.1365-2621.2001.00513.x.

- Kim, S.-S., Park, R.-Y., Jeon, H.-J., Kwon, Y.-S. and Chun, W. (2005) 'Neuroprotective Effects of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid on Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in SH-SY5Y Cells', *Phytother. Res. PHYTOTHERAPY RESEARCH* *Phytother. Res.*, 19(19), pp. 243–245. doi: 10.1002/ptr.1652.
- Kim, S. W., Kim, T., Kim, Y. S., Choi, H. S., Lim, H. J., Yang, S. J. and Park, C. R. (2012) 'Surface modifications for the effective dispersion of carbon nanotubes in solvents and polymers', *Carbon*. Elsevier Ltd, 50(1), pp. 3–33. doi: 10.1016/j.carbon.2011.08.011.
- Kopple, K. (1980) 'Mechanism of the Catalytic Hydrogen Production by Gold Sols. H/D Isotope Effect Studies', pp. 870–875.
- Korkut, S., Keskinler, B. and Erhan, E. (2008) 'An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives', *Talanta*. Elsevier, 76(5), pp. 1147–1152. doi: 10.1016/J.TALANTA.2008.05.016.
- Krasteva, N., Besnard, I., Guse, B., Bauer, R. E., Müllen, K., Yasuda, A. and Vossmeier, T. (2002) 'Self-Assembled Gold Nanoparticle/Dendrimer Composite Films for Vapor Sensing Applications', *Nano Letters*, 2(5), pp. 551–555. doi: 10.1021/nl020242s.
- Kreutzmann, S., Christensen, L. P. and Edelenbos, M. (2008) 'Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses', *LWT - Food Science and Technology*. Academic Press, 41(2), pp. 193–205. doi: 10.1016/J.LWT.2007.02.024.
- Lafuente, M. T., Lopezgalvez, G., Cantwell, M. and Yang, S. F. (1996) 'Factors influencing ethylene-induced isocoumarin formation and increased respiration in carrots', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(3), pp. 537–542.
- Lamikanra, O. and Richard, O. A. (2004) 'Storage and ultraviolet-induced tissue stress effects on fresh-cut pineapple', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), pp. 1812–1816. doi: 10.1002/jsfa.1891.
- Lamikanra, O., Richard, O. A. and Parker, A. (2002) 'Ultraviolet induced stress response in fresh cut cantaloupe', *Phytochemistry*. Pergamon, 60(1), pp. 27–32. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00048-1.
- Laurila, E. and Ahvenainen, R. (2002) 'Minimal processing of fresh fruits and vegetables.', in Jongen, W. (ed.) *Fruit and Vegetable Processing, Improving Quality.*, p. 288–309.
- Ledesma, J., Bortolato, S. A., Martino, D. M. and Boschetti, C. E. (2015) 'Fluorescence spectroscopy and multivariate analysis as a greener monitoring tool: characterization of the curing kinetics of bioinspired polymers', *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(2), pp. 26–38. doi: 10.1080/17518253.2015.1073798.

- Lee, B., Im, H.-J., Luo, H., Hagaman, E. W. and Dai, S. (2005) 'Synthesis and characterization of periodic mesoporous organosilicas as anion exchange resins for perchlorate adsorption.', *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(12), pp. 5372–5376. doi: 10.1021/la050313d.
- León, J., Rojo, E. and Sánchez-Serrano, J. J. (2001) 'Wound signalling in plants', *Journal of Experimental Botany*, 52(354), pp. 1–9. doi: 10.1093/jxb/52.354.1.
- Levitt, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses*. Edited by A. Press. London.
- Li, J., Qin, X., Yang, Z., Qi, H., Xu, Q. and Diao, G. (2013) 'A novel mesoporous silica nanosphere matrix for the immobilization of proteins and their applications as electrochemical biosensor', *Talanta*. Elsevier, 104, pp. 116–121. doi: 10.1016/J.TALANTA.2012.11.038.
- Lichtenthaler, H. K. (1996) 'Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants', *Journal of Plant Physiology*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 148(1–2), pp. 4–14. doi: 10.1111/echo.13416.
- Lien, T. T. N., Lam, T. D., An, V. T. H., Hoang, T. V., Quang, D. T., Khieu, D. Q., Tsukahara, T., Lee, Y. H. and Kim, J. S. (2010) 'Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS', *Talanta*. Elsevier, 80(3), pp. 1164–1169. doi: 10.1016/J.TALANTA.2009.09.002.
- Lin, M. S. and Leu, H. J. (2005) 'A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-based chemical sensor for cathodic determination of hydrogen peroxide', *Electroanalysis*, 17(22), pp. 2068–2073. doi: 10.1002/elan.200503335.
- Link, S. and El-sayed, M. A. (2000a) 'Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals', *Int. Reviews in Physical Chemistry*, 19(3), pp. 409–453. doi: 10.1080/01442350050034180.
- Link, S. and El-sayed, M. A. (2000b) *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, Internal reviews in Physical Chemistry*. doi: 10.1080/01442350050034180.
- Londoño, J. and De, P. (2012) 'Capítulo libro: Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad', in *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia.*, pp. 1129–162.
- Lu, B. and Kawamoto, K. (2014) 'Transition metal-rich mesoporous silicas and their enhanced catalytic properties', *Catalysis Science and Technology*. Royal Society of Chemistry, 4(12), pp. 4313–4321. doi: 10.1039/c4cy00688g.
- Lu, Z., Yu, Z., Gao, X., Lu, F. and Zhang, L. (2005) 'Preservation effects of gamma irradiation on fresh-cut



- celery', *Journal of Food Engineering*, 67(3), pp. 347–351. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.04.038.
- Luna Inca, R. E. (2004) *Efecto combinado de la luz UV-C y envases activos con antimicrobianos naturales sobre hojas de rúcula 'baby' (Eruca sativa)*. UNIVERSIDAD DE CHILE. doi: 10.1073/pnas.1210960110.
- Luo, H., Shi, Z., Li, N., Gu, Z. and Zhuang, Q. (2001) 'Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode.', *Anal. chem.*, 73(5), pp. 915–920. doi: 10.1021/ac0009671.
- Ma, G.-X., Lu, T.-H. and Xia, Y.-Y. (2007) 'Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of hemoglobin immobilized on carbon black', *Bioelectrochemistry*. Elsevier, 71(2), pp. 180–185. doi: 10.1016/J.BIOELECTCHEM.2007.04.002.
- Marchetti, S. G., Cagnoli, M. V., Alvarez, A. M., Gallegos, N. G., Bengoa, J. F., Yeramian, A. A. and Mercader, R. C. (1997) 'Dependence of the oxide-support interaction on the size and nature of iron oxide particles on SiO<sub>2</sub>', *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 58(12), pp. 2119–2125. doi: 10.1016/S0022-3697(97)00161-3.
- Martino, D. M., Reyna, D., Estenoz, D. A., Trakhtenberg, S. and Warner, J. C. (2008) 'Photosensitization of bioinspired thymine-containing polymers', *Journal of Physical Chemistry A*, 112(21), pp. 4786–4792. doi: 10.1021/jp075958w.
- Mello, L. D. and Kubota, L. T. (2002) 'Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries', *Food Chemistry*. Elsevier, 77(2), pp. 237–256. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00104-8.
- Mello, L. D., Sotomayor, M. D. P. T. and Kubota, L. T. (2003) 'HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 96(3), pp. 636–645. doi: 10.1016/J.SNB.2003.07.008.
- Miscoria, S. A., Barrera, G. D. and Rivas, G. A. (2002) 'Analytical performance of a glucose biosensor prepared by immobilization of glucose oxidase and different metals into a carbon paste electrode', *Electroanalysis*, 14(14), pp. 981–987. doi: 10.1002/1521-4109(200208)14:14<981::AID-ELAN981>3.0.CO;2-1.
- Montenegro, M. A. (2004) 'Reactividad De Oxígeno Singulete Frente a Sustancias Naturales Presentes En Alimentos', *Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Santiago del Estero*.
- Morigi, M., Scavetta, E., Berrettoni, M., Giorgetti, M. and Tonelli, D. (2001) 'Sulfate-selective electrodes based on hydrotalcites', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 439(2), pp. 265–272. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01047-9.
- Muelhaupt, R. (2013) 'Green polymer chemistry and bio-based plastics: Dreams and reality', *Macromolecular*

*Chemistry and Physics*, 214(2), pp. 159–174. doi: 10.1002/macp.201200439.

- Mutyala, S. and Mathiyarasu, J. (2014) ‘Direct electron transfer at a glucose oxidase-chitosan-modified Vulcan carbon paste electrode for electrochemical biosensing of glucose’, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), pp. 1517–1529. doi: 10.1007/s12010-013-0642-z.
- Newman, A. C. D. . and Bown, G. (1987) ‘Mineralogy Society Monograph’, in Wiley, R. (ed.). London, England.
- Nielsen, S. S. (1998) *Food Analysis*. Edited by M. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg.
- Nisha, P., Abdul Nazar, P. and Jayamurthy, P. (2009) ‘A comparative study on antioxidant activities of different varieties of Solanum melongena’, *Food and Chemical Toxicology*. Pergamon, 47(10), pp. 2640–2644. doi: 10.1016/J.FCT.2009.07.026.
- O’Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Berg, H. Van den, Hininger, I., Rousell, A.-M., Chopra, M., Southon, S. and Thurnham, D. I. (2001) ‘Carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study’, *British Journal of Nutrition*, 85(04), p. 499. doi: 10.1079/BJN2000284.
- Okawa, Y., Yokoyama, N., Sakai, Y. and Shiba, F. (2015) ‘Direct electron transfer biosensor for hydrogen peroxide carrying nanocomplex composed of horseradish peroxidase and Au-nanoparticle - Characterization and application to bienzyme systems’, *Analytical Chemistry Research*. Elsevier Ltd, 5, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ancr.2015.05.001.
- Van Olphen, H. . and Fripiat, J. J. (1979) *Data Handbook for Clay Minerals and Other Non metallic Minerals*. Pergamon, Oxford.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Buijsman, M. N. C. P., Van Amelsvoort, J. M. M. and Katan, M. B. (2003) ‘Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans 1’, *J. Nutr*, 133(September 2002), pp. 1806–1814. doi: 10.1093/jn/133.6.1806.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (2001) ‘Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans 1’, *J. Nutr*, 131(September 2000), pp. 66–71. doi: 10.1093/jn/131.1.66.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L. and Katan, M. B. (2001) ‘Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans’, *Am J Clin Nutr*, 73(July), pp. 532–8.
- Osazuwa, O., Kontopoulou, M., Xiang, P., Ye, Z. and Docoslis, A. (2012) ‘Polymer composites containing non-covalently functionalized Carbon nanotubes: A study of their dispersion characteristics and response to

- AC electric fields', *Procedia Engineering*, 42(August), pp. 1414–1424. doi: 10.1016/j.proeng.2012.07.535.
- Ottenbrite, R. M. and Ryan, W. S. (1980) 'Cyclopolymerization of N, N-Dialkyldiallylammonium Halides. a Review and Use Analysis', *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, 19(4), pp. 528–532. doi: 10.1021/i360076a009.
- Ouyang, C. S. and Wang, C. M. (1998) 'Clay-enhanced electrochemiluminescence and its application in the detection of glucose', *Journal of the Electrochemical Society*, 145(8), pp. 2654–2659. doi: 10.1149/1.1838695.
- Oyama, N. and Anson, F. C. (1986) 'Catalysis of the electroreduction of hydrogen peroxide by montmorillonite clay coatings on graphite electrodes', *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. Elsevier, 199(2), pp. 467–470. doi: 10.1016/0022-0728(86)80020-1.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Levine, M., Dutta, A. and Dutta, S. K. (2003) 'Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention', *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), pp. 18–35. doi: 10.1080/07315724.2003.10719272.
- Pálková, H., Madejová, J., Zimowska, M. and Serwicka, E. M. (2010) 'Laponite-derived porous clay heterostructures: II. FTIR study of the structure evolution', *Microporous and Mesoporous Materials*. Elsevier, 127(3), pp. 237–244. doi: 10.1016/J.MICROMESO.2009.07.012.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Teixeira, F., Falquet, L., Ioannidis, V., Rouhier, N., Dunand, C., Margis-Pinheiro, M., Cosio, C. and Penel, C. (2007) 'PeroxiBase: The peroxidase database', *Phytochemistry*, 68(12), pp. 1605–1611. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.005.
- Paul, N. D. and Gwynn-Jones, D. (2003) 'Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach', *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 18(1), pp. 48–55. doi: 10.1016/S0169-5347(02)00014-9.
- Paz Zanini, V. I. ., Tulli, F., Martino, D. M. ., López de Mishima, B. and Borsarelli, C. D. . (2013) 'Improvement of the amperometric response to l-lactate by using a cationic bioinspired thymine polycation in a bioelectrode with immobilized lactate oxidase', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 181, pp. 251–258. doi: 10.1016/J.SNB.2013.01.061.
- Paz Zanini, V. I., Gavilán, M., López de Mishima, B. A., Martino, D. M. and Borsarelli, C. D. (2016) 'A highly sensitive and stable glucose biosensor using thymine-based polycations into laponite hydrogel films', *Talanta*. Elsevier, 150, pp. 646–654. doi: 10.1016/J.TALANTA.2015.12.046.
- Paz Zanini, V. I., Linarez Pérez, O. E., Teijelo, M. L., Labbé, P., Lopez de Mishima, B. A. and Borsarelli, C. D.

- (2017) 'Development of a bioelectrode fabricated with a multilayer thin film of poly(diallyldimethylammonium)/gold-nanoparticle/lactate oxidase for analysis of l-lactate in food samples', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 247, pp. 830–839. doi: 10.1016/J.SNB.2017.03.103.
- Paz Zanini, V. I., Tulli, F., Martino, D. M., López De Mishima, B. and Borsarelli, C. D. (2013) 'Improvement of the amperometric response to l-lactate by using a cationic bioinspired thymine polycation in a bioelectrode with immobilized lactate oxidase', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 181, pp. 251–258. doi: 10.1016/j.snb.2013.01.061.
- Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C. and Danet, A. F. (2009) 'Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches', *Molecules*, 14(1), pp. 480–493. doi: 10.3390/molecules14010480.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson, 97, pp. 55–74. doi: 10.1016/J.EJMECH.2015.04.040.
- Plazas, M., Andújar, I., Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P., Herraiz, F. J. and Prohens, J. (2013) 'Breeding for Chlorogenic Acid Content in Eggplant: Interest and Prospects', *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), pp. 26–35. doi: 10.15835/NBHA4119036.
- Plazas, M., López-Gresa, M. P., Vilanova, S., Torres, C., Hurtado, M., Gramazio, P., Andújar, I., Herráiz, F. J., Bellés, J. M. and Prohens, J. (2013) 'Diversity and relationships in key traits for functional and apparent quality in a collection of eggplant: Fruit phenolics content, antioxidant activity, polyphenol oxidase activity, and browning', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), pp. 8871–8879. doi: 10.1021/jf402429k.
- Pombo, M. A., Dotto, M. C., Martínez, G. A. and Civello, P. M. (2009) 'UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 51(2), pp. 141–148. doi: 10.1016/J.POSTHARVBIO.2008.07.007.
- Pournaghi-Azar, M. H. and Razmi-Nerbin, H. (2001) 'Electrocatalytic characteristics of thiosulfate oxidation at nickel plated aluminum electrode modified with nickel pentacyanonitrosylferrate films', *Electroanalysis*, 13(6), pp. 465–470. doi: 10.1002/1521-4109(200104)13:6<465::AID-ELAN465>3.0.CO;2-Q.
- Poyard, S., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Cosnier, S. and Labbe, P. (1998) 'Optimization of an inorganic/bio-organic matrix for the development of new glucose biosensor membranes', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 364(1–3), pp. 165–172. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00184-6.

- Poyard, S., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Cosnier, S., Labbe, P. and Besombes, J. L. (1996a) 'A new method for the controlled immobilization of enzyme in inorganic gels (laponite) for amperometric glucose biosensing', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 33(1–3), pp. 44–49. doi: 10.1016/0925-4005(96)01910-7.
- Poyard, S., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Cosnier, S., Labbe, P. and Besombes, J. L. (1996b) 'A new method for the controlled immobilization of enzyme in inorganic gels (laponite) for amperometric glucose biosensing', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 33(1–3), pp. 44–49. doi: 10.1016/0925-4005(96)01910-7.
- Prakash, A., Manley, J., Decosta, S., Caporaso, F. and Foley, D. (2011) 'See Eguchi 2011, undescribed species in Vietnam', 63, pp. 387–390. doi: 10.1016/S0969-806X(01)00529-1.
- Pravda, M. (1998) 'Applications of Electrochemical Sensors and Detection Systems in Biomedical Analysis', *Pharmaceutical Sciences*.
- Pretcher (1985) *Instrumental Methods in Electrochemical*. doi: 10.1016/0302-4598(86)85047-4.
- Ragaert, P., Verbeke, W., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2004) 'Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits', *Food Quality and Preference*. Elsevier, 15(3), pp. 259–270. doi: 10.1016/S0950-3293(03)00066-1.
- Raghu, P., Madhusudana Reddy, T., Reddaiah, K., Jaidev, L. R. and Narasimha, G. (2013) 'A novel electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles/poly(l-arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of pyrogallol/hydroquinone', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, 52(6–7), pp. 377–385. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2013.02.010.
- Rao, M. A., Sannino, F. and Saccomandi, F. (2002) 'Enzymes in soil: Properties, behavior and potential applications', *Developments in Soil Science*. Elsevier, 28, pp. 301–327. doi: 10.1016/S0166-2481(02)80027-7.
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M. and Barry-Ryan, C. (2006) 'Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 18(7), pp. 373–386. doi: 10.1016/j.tifs.2007.03.011.
- Ristic, L. and D'Aragona, F. S. . (1994) *Sensor Technology and Devices (Optoelectronics Library)*. Edited by L. Ristic. Boston, USA,: Artech House.
- Rivera-Pastrana, D. M., Gardea Béjar, A. A., Martínez Téllez, M. A., Dominguez, M. R. and Gonzalez-Aguilar, G. A. (2007) 'Postharvest biochemical effects of UV-C irradiation on fruit and vegetables.', *Revista Fitotecnia Mexicana.*, p. 30:361–372.

- Robinson, W. E., Cordeiro, M., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S. A., Reinecke, M. G. and Mitchell, W. M. (1996) 'Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase.', *Mol Pharmacol*, 50(4), pp. 846–855.
- Rolle, R. S. and Chism, G. W. (1987) 'Physiological consequences of minimally processed fruits and vegetables', *Journal of Food Quality*, 10(10), pp. 157–177. doi: 10.1111/j.1745-4557.1987.tb00856.x.
- Roucoux, A., Schulz, J. and Patin, H. (2002) 'Reduced transition metal colloids: A novel family of reusable catalysts?', *Chemical Reviews*, 102(10), pp. 3757–3778. doi: 10.1021/cr010350j.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L. O. and Caldwell, M. (1997) 'UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation', *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 12(1), pp. 22–28. doi: 10.1016/S0169-5347(96)10062-8.
- Rueda, M., Aldaz, A. and Sanchez-Burgos, F. (1978) 'Oxidation of L-ascorbic acid on a gold electrode', *Electrochimica Acta*, 23(5), pp. 419–424. doi: 10.1016/0013-4686(78)87040-6.
- Ruiz-Cruz, S., Islas-Osuna, M. A., Sotelo-Mundo, R. R., Vázquez-Ortiz, F. and González-Aguilar, G. A. (2007) 'Sanitation procedure affects biochemical and nutritional changes of shredded carrots', *Journal of Food Science*, 72(2), pp. 146–152. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00279.x.
- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L. and Marko-Varga, G. (1996) 'Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 330(2–3), pp. 123–138. doi: 10.1016/0003-2670(96)00169-9.
- Sabzi, M. E. and Pournaghi-Azar, R. H. (2005) 'Electrocatalytic Determination of Ascorbic Acid on a Glassy Pentacyanonitrosylferrate', *Analytical Chemistry*, 21(June), pp. 689–692.
- Sahoo, A. R., Lalitha, G., Muruges, V., Bruneau, C., Sharma, G. V. M., Suresh, S. and Achard, M. (2017) 'Ruthenium phosphine-pyridone catalyzed cross-coupling of alcohols to form  $\alpha$ -alkylated ketones', *Journal of Organic Chemistry*, 82(19), pp. 10727–10731. doi: 10.1021/acs.joc.7b02042.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K. (2003) 'Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), pp. 571–581. doi: 10.1021/jf020926l.
- Saltveit, M. E. (2000) 'Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 21(1), pp. 61–69. doi: 10.1016/S0925-5214(00)00165-4.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M. and Iseki, K. (2011) 'In

- vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 403(1–2), pp. 136–138. doi: 10.1016/J.IJPHARM.2010.09.035.
- Sayari, A., Hamoudi, S. and Yang, Y. (2005) 'Applications of pore-expanded mesoporous silica. 1. Removal of heavy metal cations and organic pollutants from wastewater', *Chemistry of Materials*, 17(1), pp. 212–216. doi: 10.1021/cm048393e.
- Scheller, F. and Schubert, F. (1992) *Biosensors: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Amsterdam, London, New York, Tokyo: Vol. 11, Elsevier Science Publishers B. V.
- Senillou, A., Jaffrezic, N., Martelet, C. and Cosnier, S. (1999) 'A laponite clay-poly(pyrrole–pyridinium) matrix for the fabrication of conductimetric biosensors', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 401(1–2), pp. 117–124. doi: 10.1016/S0003-2670(99)00520-6.
- Šeruga, M., Novak, I. and Jakobek, L. (2011) 'Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods', *Food Chemistry*, 124(3), pp. 1208–1216. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.047.
- Shenhar, R., Norsten, T. B. and Rotello, V. M. (2005) 'Polymer-mediated nanoparticle assembly: Structural control and applications', *Advanced Materials*, 17(6), pp. 657–669. doi: 10.1002/adma.200401291.
- Shipway, A. N., Lahav, M. and Willner, I. (2000) 'Nanostructured gold colloid electrodes', *Advanced Materials*, 12(13), pp. 993–998. doi: 10.1002/1521-4095(200006)12:13<993::AID-ADMA993>3.0.CO;2-3.
- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. R. (1992) 'Antioxidant Functions of Vitamins', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669(1), pp. 7–20.
- Simões, A. D. N., Tudela, J. A., Allende, A., Puschmann, R. and Gil, M. I. (2009) 'Edible coatings containing chitosan and moderate modified atmospheres maintain quality and enhance phytochemicals of carrot sticks', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 51(3), pp. 364–370. doi: 10.1016/J.POSTHARVBIO.2008.08.012.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) 'Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents', *American Journal of enology and viticulture*, 16, p. 144.
- Skogerboe, R. K. and Grant, C. L. (1970) 'Comments on the definitions of the terms sensitivity and detection limit', *Spectroscopy Letters*, 3(8–9), pp. 215–220. doi: 10.1080/00387017008081956.
- Smirnoff, N. (2018) 'Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 122, pp. 116–129. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.03.033.

- Sohn, B. H., Choi, J. M., Yoo, S. Il, Yun, S. H., Zin, W. C., Jung, J. C., Kanehara, M., Hirata, T. and Teranishi, T. (2003) 'Directed self-assembly of two kinds of nanoparticles utilizing monolayer films of diblock copolymer micelles', *Journal of the American Chemical Society*, 125(21), pp. 6368–6369. doi: 10.1021/ja035069w.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry 4th Edition*. New York: Freeman, H. W. and Company.
- Sun, X., Dong, S. and Wang, E. (2004) 'One-step preparation and characterization of poly(propyleneimine) dendrimer-protected silver nanoclusters', *Macromolecules*, 37(19), pp. 7105–7108. doi: 10.1021/ma048847t.
- Surjadinata, B. B. and Cisneros-Zevallos, L. (2003) 'Modeling Wound-induced Respiration of Fresh-cut Carrots (*Daucus carota* L.)', *Journal of Food Science*, 68(9), pp. 2735–2740. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05797.x.
- Surjadinata, B. B. and Cisneros-Zevallos, L. (2012) 'Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity', *Food Chemistry*. Elsevier, 134(2), pp. 615–624. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.097.
- Susumu, H., Katsutomo, S., Hiroyuki, I., Yuko, O. and Hirokazu, M. (2017) 'A Large Family of Class III Plant Peroxidases', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 127(5), pp. 43–87. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.04.005.
- Švancara, I., Kalcher, K., Walcarius, A. and Vytrás, K. (2012) 'Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes', in *Chemically modified carbon paste electrodes*. Florida: Press Taylor & Francis Group, pp. 73–108.
- Takemoto, K. (1976) 'Functional monomers and polymers containig nucleic acid bases', 125(55), pp. 105–125.
- Talcott, S. ., Howard, L. . and Brenes, C. . (2001) 'Factors contributing to taste and quality of commercially processed strained carrots', *Food Research International*. Elsevier, 34(1), pp. 31–38. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00125-3.
- Theis, A. T. (2004) 'S : Sensory and Nutritive Qualities of Food Quality of Fresh-cut Apple Slices as Affected by Low-dose Ionizing Radiation and Calcium Ascorbate Treatment', *Science*, (1998).
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, G. S. (2001) 'Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 16(1–2), pp. 121–131. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- Thom, E. (2007) 'The Effect of chlorogenic acid (Svetol™) and chlorogenic enriched coffee (CoffeeSLENDER®) on the glucose profile and bodyweight in healthy volunteers', *The Journal of International Medical*



*Research*, 35, pp. 900–908.

- Thompson, D. W. and Butterworth, J. T. (1992) ‘The nature of laponite and its aqueous dispersions’, *Journal of Colloid and Interface Science*. Academic Press, 151(1), pp. 236–243. doi: 10.1016/0021-9797(92)90254-J.
- Thompson, R. C., Moore, C. J., Saal, F. S. V. and Swan, S. H. (2009) ‘Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), pp. 2153–2166. doi: 10.1098/rstb.2009.0053.
- Tian, Y., Mao, L., Okajima, T. and Ohsaka, T. (2002) ‘Biosensor for Superoxide Anion’, *Analytical chemistry*, 74(10), pp. 2428–2434.
- Toivonen, P. M. A. and DeEll, J. R. (2002) *Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. I*. Edited by O. Lamikanra.
- Topcu Sulak, M., Erhan, E. and Keskinler, B. (2010) ‘Amperometric phenol biosensor based on horseradish peroxidase entrapped PVF and PPy composite film coated GC electrode’, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), pp. 856–867. doi: 10.1007/s12010-009-8534-y.
- Touloupakis, E., Chatzipetrou, M., Boutopoulos, C., Gkouzou, A. and Zergioti, I. (2014) ‘A polyphenol biosensor realized by laser printing technology’, *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 193, pp. 301–305. doi: 10.1016/J.SNB.2013.11.110.
- Trakhtenberg, S., Hangun-Balkir, Y., Warner, J. C., Bruno, F. F., Kumar, J., Nagarajan, R. and Samuelson, L. A. (2005) ‘No Title’, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, p. 9100.
- Trakhtenberg, S., Hangun-Balkir, Y., Warner, J. C., Bruno, F. F., Kumar, J., Nagarajan, R. and Samuelson, L. A. (2005) ‘Photo-cross-linked immobilization of polyelectrolytes for enzymatic construction of conductive nanocomposites’, *Journal of the American Chemical Society*, 127(25), pp. 9100–9104. doi: 10.1021/ja042438v.
- Trevañ, M. (1990) *Bioteconología: principios biológicos*. Edited by M. Trevañ, S. Boffey, K. Goulding, and P. Stanbury. Editorial Acribia.
- Trevañ, M. . (1980) *Immobilized enzymes. An introduction and applications in biotechnology*. Trevañ, M John Wiley & Sons.
- Tulli, F., Gulotta, F. A., Martino, D. M., Zanini, V. I. P. and Borsarelli, C. D. (2018) ‘Ultrasensitive Amperometric Biosensing of Polyphenols Using Horseradish Peroxidase Immobilized in a Laponite/Au/DNA-Bioinspired Polycation Nanocomposite’, *Journal of The Electrochemical Society*,

165(10), pp. B452–B457. doi: 10.1149/2.1191810jes.

- Umasankar, Y., Thiagarajan, S. and Chen, S. M. (2007) ‘Nanocomposite of functionalized multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano gold biosensing film for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid’, *Analytical Biochemistry*, 365(1), pp. 122–131. doi: 10.1016/j.ab.2007.02.034.
- Ursachi, I., Vasile, A., Ianculescu, A., Vasile, E. and Stancu, A. (2011) ‘Ultrasonic-assisted synthesis and magnetic studies of iron oxide/MCM-41 nanocomposite’, *Materials Chemistry and Physics*. Elsevier B.V., 130(3), pp. 1251–1259. doi: 10.1016/j.matchemphys.2011.09.004.
- Vaccari, A. (1998) ‘Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays’, *Catalysis Today*. Elsevier, 41(1–3), pp. 53–71. doi: 10.1016/S0920-5861(98)00038-8.
- Vaccari, A. (1999) ‘Clays and catalysis: a promising future’, *Applied Clay Science*. Elsevier, 14(4), pp. 161–198. doi: 10.1016/S0169-1317(98)00058-1.
- Valpuesta, V. and Botella, M. A. (2004) ‘Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant’, *Trends in Plant Science*, 9(12), pp. 573–577. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.002.
- Veitch, N. C. (2004) ‘Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme’, *Phytochemistry*. Pergamon, 65(3), pp. 249–259. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2003.10.022.
- Vengatajalabathy Gobi, K. and Mizutani, F. (2001) ‘Layer-by-layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol’, *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 80(3), pp. 272–277. doi: 10.1016/S0925-4005(01)00911-X.
- Vicente, A. R., Pineda, C., Lemoine, L., Civello, P. M., Martinez, G. A. and Chaves, A. R. (2005) ‘UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper’, *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 35(1), pp. 69–78. doi: 10.1016/J.POSTHARVBIO.2004.06.001.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1995) *Biochemistry 2nd Edition*. Edited by I. Wiley, J. & Sons. New York.
- Walcarius, A. (2013) ‘Mesoporous materials and electrochemistry’, *Chemical Society Reviews*, 42(9), pp. 4098–4140. doi: 10.1039/c2cs35322a.
- Wandrey, C., Hernández-Barajas, J. and Hunkeler, D. (1999) ‘Diallyldimethylammonium Chloride and its Polymers’, *Radical Polymerisation Polyelectrolytes*, 145, pp. 123–183. doi: 10.1007/3-540-70733-6\_3.
- Wang, G.-F., Shi, L.-P., Ren, Y.-D., Liu, Q.-F., Liu, H.-F., Zhang, R.-J., Li, Z., Zhu, F.-H., He, P.-L., Tang, W., Tao, P.-Z., Li, C., Zhao, W.-M. and Zuo, J.-P. (2009) ‘Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid,

- quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro', *Antiviral Research*. Elsevier, 83(2), pp. 186–190. doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.05.002.
- Wantz, F., Banks, C. E. and Compton, R. G. (2005) 'Direct oxidation of ascorbic acid at an edge plane pyrolytic graphite electrode: A comparison of the electroanalytical response with other carbon electrodes', *Electroanalysis*, 17(17), pp. 1529–1533. doi: 10.1002/elan.200503259.
- Warner, J. C., Cannon, A. S. and Dye, K. M. (2004) 'Green chemistry', *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7–8), pp. 775–799. doi: 10.1016/j.eiar.2004.06.006.
- Warner, J., Cannon, A., Raudys, J. and Undurti., A. (2004) 'Photo-reactive polymers and devices for use in hair treatments.'
- Warner, J., Morelli, A. and Ku, M. (2003) 'Biodegradable polymers'.
- Watanabe, L., de Moura, P. R., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L. S., Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Bursakov, S., Roig, M. G., Shnyrov, V. L. and Polikarpov, I. (2010) 'Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*)', *Journal of Structural Biology*. Academic Press, 169(2), pp. 226–242. doi: 10.1016/J.JSB.2009.10.009.
- Watson, K. J., Zhu, J., Nguyen, S. T. and Mirkin, C. a. (1998) 'Hybrid Nanoparticles with Block Copolymer Shell Structures', *Journal of the American Chemical Society*, 121(2), pp. 462–463. doi: 10.1021/ja983173l.
- Whitfield, J., Morelli, A. and Warner, J. C. (2005) 'Enzymatic Reversal of Polymeric Thymine Photocrosslinking with E. coli DNA Photolyase', *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, 11(42), pp. 1541–1546.
- Xu, Q., Mao, C., Liu, N. N., Zhu, J. J. and Sheng, J. (2006) 'Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite', *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), pp. 768–773. doi: 10.1016/j.bios.2006.02.010.
- Yan, Y., Wu, X. and Zhang, H. (2016) 'Catalytic wet peroxide oxidation of phenol over Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/MCM-41 in a fixed bed reactor', *Separation and Purification Technology*. Elsevier, 171, pp. 52–61. doi: 10.1016/j.seppur.2016.06.047.
- Yang, D. Q., Rochelte, J. F. and Sacher, E. (2005) 'Spectroscopic evidence for  $\pi$ - $\pi$  interaction between poly(diallyl dimethylammonium) chloride and multiwalled carbon nanotubes', *Journal of Physical Chemistry B*, 109(10), pp. 4481–4484. doi: 10.1021/jp044511+.
- Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z. and Lin, X. (2006) 'Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-

layer technique for the determination of phenolic compounds', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 114(2), pp. 774–780. doi: 10.1016/J.SNB.2005.07.035.

Yao, K., Shimazu, K., Nakata, M. and Yamagishi, A. (1998) 'Clay-modified electrodes as studied by the quartz crystal microbalance: adsorption of ruthenium complexes', *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 442(1–2), pp. 235–242. doi: 10.1016/S0022-0728(97)00445-2.

Yao, K., Shimazu, K., Nakata, M. and Yamagishi, A. (1998) 'Clay-modified electrodes as studied by the quartz crystal microbalance: Redox processes of ruthenium and iron complexes', *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 443(2), pp. 253–261. doi: 10.1016/S0022-0728(97)00549-4.

Yao, K., Taniguchi, M., Nakata, M., Shimazu, K., Takahashi, M. and Yamagishi, A. (1998) 'Mass transport on an anionic clay-modified electrode as studied by a quartz crystal microbalance', *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Elsevier, 457(1–2), pp. 119–128. doi: 10.1016/S0022-0728(98)00309-X.

Yeh, Y.-C., Creran, B. and Rotello, V. M. (2012) 'Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology', *Nanoscale*, 4(6), pp. 1871–1880. doi: 10.1039/C1NR11188D.

Yoplac Tafur, I. J. (2012) *Efecto de la radiación UV-C y atmósferas modificadas activas sobre la calidad microbiológica y funcional de rúcula*. Universidad de Chile.

Yu, Y., Chen, Z., He, S., Zhang, B., Li, X. and Yao, M. (2014) 'Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 52, pp. 147–152. doi: 10.1016/j.bios.2013.08.043.

Zaidi, S. A. and Shin, J. H. (2016) 'Recent developments in nanostructure based electrochemical glucose sensors', *Talanta*. Elsevier, 149, pp. 30–42. doi: 10.1016/J.TALANTA.2015.11.033.

Zanini, V. P., López de Mishima, B. and Solís, V. (2011) 'An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite–chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 155(1), pp. 75–80. doi: 10.1016/J.SNB.2010.11.026.

Zare, H. R., Nasirizadeh, N. and Mazloun Ardakani, M. (2005) 'Electrochemical properties of a tetrabromo-p-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid', *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 577(1), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.jelechem.2004.11.010.

Zaro, M. J. (2014) 'Changes in bioactive compounds and response to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier B.V.,

96(July), pp. 110–117. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.012.

Zhou, Y., Tang, L., Zeng, G., Chen, J., Cai, Y., Zhang, Y., Yang, G., Liu, Y., Zhang, C. and Tang, W. (2014) ‘Mesoporous carbon nitride based biosensor for highly sensitive and selective analysis of phenol and catechol in compost bioremediation’, *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 61, pp. 519–525. doi: 10.1016/J.BIOS.2014.05.063.

Zhu, K., Cordeiro, M. L., Atienza, J., Robinson, W. E. and Chow, S. A. (1999) ‘Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids.’, *J Virol*, 73(4), pp. 3309–3316.

Zoski, C. G. (2007) *Handbook of Electrochemistry, Handbook of Electrochemistry*. doi: 10.1016/B978-044451958-0.50027-6.