

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química



TESIS PARA ACCEDER AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

***“Estudio electroquímico de antioxidantes fenólicos presentes en
hierbas aromáticas. Determinaciones electroanalíticas.
Biosensores”***

LICENCIADA JIMENA CLAUDIA LOPEZ

DIRECTORA: Dra. María Alicia Zon

Co-DIRECTOR: Dr. Adrian Marcelo Granero

Río Cuarto, 14 de agosto de 2019

COMISIÓN ASESORA

.....

Dra. María Inés Medina

Departamento de Biología Molecular,
Universidad Nacional de Río Cuarto

.....

Dr. Gabriel Ángel Planes

Departamento de Química
Universidad Nacional de Río Cuarto

.....

Dr. Gustavo Adolfo Rivas

Departamento de Fisicoquímica. INFIQC.

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

DIRECTORA Y CO-DIRECTOR

.....

Dra. María Alicia Zon

.....

Dr. Adrian Marcelo Granero

Listado de artículos

- **Robledo, S. N., J. C. Lopez, A. M. Granero, M. A. Zensich, G. M. Morales, H. Fernández, M.A. Zon**
“Characterization of the surface redox process of caffeic acid adsorbed at glassy carbon electrodes modified with partially reduced graphene oxide”
J. Electroanal. Chem. **783** (2016) 258-267.
- **Díaz Nieto, C. H., A. M. Granero, J. C. Lopez, G. D. Pierini, G. J. Levin, H. Fernández, M.A. Zon**
“Development of a third generation biosensor to determine hydrogen peroxide based on a composite of soybean peroxidase/chemically reduced graphene oxide deposited on glassy carbon electrodes”
Sens. Actuators B: Chem. **263** (2018) 377-386.
- **Lopez, J. C., M. A. Zon, H. Fernández, A. M. Granero, S. N. Robledo**
“Determination of thermodynamic and kinetic parameters of the enzymatic reaction between soybean peroxidase and natural antioxidants using chemometric tools”, Food Chem. **275** (2019) 161-186.
- **Lopez, J. C., M. A. Zon, S. N. Robledo, H. Fernández, A. M. Granero**
“Electrochemical behavior of eugenol adsorbed at glassy carbon electrodes modified with electrochemically partially reduced graphene oxide”,
J. Electroanal. Chem. (2019), enviado.
- **Lopez, J. C., M. A. Zon, H. Fernández, A. M. Granero**, “Development of an enzymatic biosensor to determine Eugenol in dental samples”.
En preparación para ser enviado a Talanta.

Capítulo de Libro

- **G. D. Pierini, S. N. Robledo, J. C. Lopez, A. Y. Tesio, H. Fernández, A. M. Granero, M. A. Zon.**

“Glassy carbon electrodes: Studies regarding antioxidant reaction mechanisms and their electroanalytical applications”

Capítulo N° 6. En Maryann C. Wythers (Editor). *“Advances in Materials Science Research”*. (2017). Nueva York, EE. UU. Nova Science Publishers, Inc. New York. ISBN: 978-1-53611-790-5.

Publicaciones en Congresos

- Lopez, J.C., Granero, A. M., Robledo, S. N., Zensich, M., Morales, G. M., Fernández, H., Zon, M. A.

“Oxidación electroquímica de eugenol sobre electrodos de carbono vitreo modificados con óxido de grafeno reducido”.

XIX Congreso Argentino de Físico Química y Química Inorgánica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 12-15 de abril de 2015.

- Lopez, J.C., Robledo, S. N., Granero, A. M., Fernández, H., Zon, M. A.

“Determinación de parámetros cinéticos de la reacción enzimática entre la enzima peroxidasa de soja y antioxidantes naturales usando herramientas quimiométricas”.

XX Congreso Argentino de Físico Química y Química Inorgánica. Villa Carlos Paz. 16-19 de mayo de 2017.

-Lopez, J. C., Granero, A. M., Robledo, S. N., Fernández, H., Zon, M. A. *“Biosensor amperométrico basado en la inmovilización de un conjugado peroxidasa de soja-adamantano sobre un compósito óxido de grafeno reducido químicamente-betaciclodextrina, con nanopartículas de oro, para la detección de peróxido de hidrógeno”.*

IX Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto. 7-10 de noviembre de 2017

-Lopez, J.C., Zon, M.A., Fernández, H., Granero, A.M. *“Desarrollo de un biosensor enzimático para la determinación de Eugenol en muestras de materiales dentales”.*

X Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Rosa de La Pampa. 17 - 20 de Setiembre de 2019.

•

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a quienes forman parte de esta historia y, en especial, de este capítulo de mi vida:

- A Dios por permitirme despertar cada mañana, por darme la oportunidad de vivir esta vida.
- A David, por tu amor incondicional, con eso resumo todo.
- A Joaquín, por haberme enseñado todo de nuevo en esta vida.
- A mi mamá Ester y a mi papá Justo, quienes decidieron traerme a este mundo con todo el amor y jamás dejaron que me falte absolutamente nada, desde todos los puntos de vista.
- A mis hermanos Andrea y Alejandro y a mi hermano de corazón Cristian, por el apoyo, por el sostén, por cuidar siempre de mí.
- A esos pequeños soles Benja, Facu e Isa que hacen que mi vida sea un poco más alegre divirtiéndome a mi corazón.
- A mi ángel del cielo, nona: sé que siempre estás conmigo.
- A mi familia "política", los Possetto, por haberme aceptado y brindado tanto cariño.
- A mis amigas de toda la vida, las que han transitado desde siempre a mi lado.
- A los Químicos, lo más valioso de la vida universitaria, por cada momento, por cada risa y por cada lágrima.
- A Alicia y Adrian, por la formación brindada en estos 5 años, por la confianza, la comprensión, el cariño y ¡el aguante!
- A Seba y a Tito por todas sus horas de enseñanza y acompañamiento.
- A los integrantes de GEANA, por el compañerismo incondicional y por las horas de laboratorio compartidas tan amenas.
- A los chicos del Gran Becario, por aceptarme así, por sus ayudas cada vez que así lo precise, por la buena onda, por cada mate y cada postre.
- A Cacho y Maricel, por ser de fierro, por tener siempre una sonrisa y una mano tendida para ayudar.
- A CONICET por haber financiado mis estudios de posgrado.
- A mi querida UNRC por permitir mi formación de grado y posgrado de manera pública y gratuita. ¡Cuán valiosa es nuestra Universidad! ¡Viva la educación pública y gratuita!

Para los amores de mi vida, David y Joaquín

RESUMEN

Se realizó la caracterización electroquímica de eugenol (EUG), isoeugenol (IEUG) y vainillina (VAI) sobre electrodos de carbono vítreo (ECV), carbono vítreo modificado con óxido de grafeno (ECV/OG) y con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente (ECV/OGPRE).

Se determinó qué modelo de isoterma de adsorción describe mejor la interacción entre EUG y el ECV/OGPRE. La mejor isoterma de adsorción es la de Freundlich, donde se obtuvo un valor de β de 14 ± 4 y un valor de $0,51 \pm 0,05$.

Se calculó el valor de pKa para EUG, IEUG y VAI a partir de medidas espectrofotométricas.

Se estudió la cinética de la reacción enzimática entre la enzima peroxidasa de soja (EPS) y EUG, IEUG y VAI. Se obtuvieron las mejores condiciones en que pueden ser llevadas a cabo las reacciones enzimáticas mediante un diseño experimental. Se calcularon los valores de k_1 y k_3 para cada uno de los antioxidantes.

Se desarrolló un biosensor enzimático amperométrico, basado en la inmovilización de un conjugado formado por la EPS y adamantano (EPS-ADA) sobre un ECV modificado con el compuesto de óxido de grafeno reducido químicamente y betaciclodextrina (OGRQ- β CD). Sobre el electrodo modificado se generaron, también, nanopartículas de oro (NPsAu).

Primero el biosensor se utilizó para detectar H_2O_2 . Este biosensor muestra un intervalo lineal de 4×10^{-4} M a 1×10^{-3} M. La sensibilidad es de $(3,10 \pm 0,09) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. El LOD y el LOQ fueron 1×10^{-4} M y 4×10^{-4} M, respectivamente.

Luego, el biosensor se utilizó para determinar EUG. En este caso, el biosensor presentó un intervalo lineal entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-5} M. La sensibilidad fue de $(7,4 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. El LOD y el LOQ fueron $3,1 \times 10^{-8}$ M y 1×10^{-7} M, respectivamente. Finalmente, este biosensor fue utilizado para la determinación de EUG en muestras reales de uso odontológico con porcentajes de recuperación satisfactorios.

ABSTRACT

The electrochemical characterization of eugenol (EUG), isoeugenol (IEUG) and vanillin (VAI) on glassy carbon electrodes (GCE), modified glassy carbon electrodes with graphene oxide (GCE / GO), and glassy carbon electrodes modified with partially reduced electrochemical graphene oxide (GCE/ PREGO).

It was determined which adsorption isotherm model the best describes the interaction between EUG and GCE / PREGO, being this the Freundlich isotherm, where a β value of 14 ± 4 and a n value of 0.51 ± 0.05 were obtained.

The pKa values for EUG, IEUG and VAI were calculated from spectrophotometric measurements.

The kinetics of the enzymatic reaction between soybean enzyme peroxidase (SBP) and EUG, IEUG and VAI were studied. The best conditions were obtained for the enzymatic reactions using an experimental design. The values of k_1 and k_3 were calculated for each of the antioxidant.

An enzymatic amperometric biosensor was developed, based on the immobilization of a conjugate formed by SBP and adamantane (SBP-ADA) on a GCE modified with the chemically reduced graphene oxide composite and beta-cyclodextrin (CRGO- β CD). Gold nanoparticles (NPsAu) were also used on the modified electrode.

First the biosensor was used to detect H_2O_2 . This biosensor shows a linear range from 4×10^{-4} M to 1×10^{-3} M. The sensitivity was $(3.10 \pm 0.09) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. The LOD and the LOQ were 1×10^{-4} M and 4×10^{-4} M, respectively.

Then, the biosensor was used to determine EUG. In this case, the biosensor presented a linear range between 1×10^{-7} M and 1×10^{-5} M. The sensitivity was $(7,4 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. The LOD and the LOQ were 3.1×10^{-8} M and 1×10^{-7} M, respectively. Finally, this biosensor was used for the determination of EUG in real samples of dental use with satisfactory recovery percentages.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Los objetivos generales de este plan de trabajo son estudiar el mecanismo de reacción electroquímica de los antioxidantes naturales eugenol (EUG), isoeugenol (IEUG) y vainillina (VAI) sobre electrodos de carbono vítreo desnudos (ECV) y modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente (ECV/OGPRE), como así también la probable adsorción de estos sustratos sobre la superficie de estos electrodos, lo que permitiría emplear la técnica de redisolución (“stripping”), con acumulación adsortiva para la determinación de los mismos, con la consiguiente ventaja que ofrece esta técnica en cuanto a la disminución de los límites de detección.

Además, se propone diseñar un biosensor electroquímico para la detección de EUG, basado en la aplicación de la enzima peroxidasa de soja (EPS), inmovilizada sobre un ECV modificado con un compuesto formado por óxido de grafeno reducido químicamente y betaciclodextrina (OGRQ- β CD) y evaluar las posibles aplicaciones analíticas de este bioelectrodo en la cuantificación sensible y selectiva de este antioxidante en muestras reales.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar los mecanismos de reacción electroquímica y propiedades superficiales (adsorción) de los antioxidantes EUG, IEUG y VAI. Aportar datos sobre sus propiedades termodinámicas, cinéticas y electroanalíticas.
- 2) Estudiar las propiedades de ECV y ECV/OGPRE
- 3) Determinar las constantes de acidez aparentes (K_a^{AP}) de EUG, IEUG y VAI.
- 4) Estudiar la cinética de la reacción enzimática entre EPS y los antioxidantes EUG, IEUG y VAI.
- 5) Diseñar, estudiar y caracterizar un biosensor, inmovilizando la EPS sobre la superficie de electrodos de carbono vítreo modificados con OGRQ- β CD, para la determinación de EUG. Calcular los parámetros cinéticos del biosensor y evaluar sus aplicaciones analíticas para la determinación de este compuesto en muestras reales.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	26
ÍNDICE DE TABLAS	38
ABREVIACIONES	40
SÍMBOLOS	44
CAPÍTULO 1: ANTIOXIDANTES FENÓLICOS	50
1.1. GENERALIDADES	52
1.2. EUGENOL	53
<i>1.2.1. El clavo de olor</i>	53
<i>1.2.2. Propiedades físicas y químicas</i>	55
<i>1.2.3. Otras propiedades y usos</i>	55
<i>1.2.4. Estudios y determinaciones de eugenol: ¿qué se conoce hasta el momento?</i>	56
1.2.4.1. Métodos cromatográficos	56
1.2.4.2. Métodos electroquímicos	57
1.3. ISOEUGENOL	60
<i>1.3.1. Propiedades físicas y químicas</i>	60
<i>1.3.2. Otras propiedades y usos</i>	61
<i>1.3.3. Estudios electroquímicos</i>	61
1.4. VAINILLINA	64
<i>1.4.1. Propiedades físicas y químicas</i>	64
<i>1.4.2. Otras propiedades, usos y fuentes</i>	64
<i>1.4.3. Estudios electroquímicos</i>	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	74
2.1. ASPECTOS ELECTROQUÍMICOS	76
<i>2.1.1. Cuestiones generales</i>	76
<i>2.1.2. Procesos faradaicos y no faradaicos</i>	78
<i>2.1.3. Doble capa eléctrica</i>	78

2.1.4. <i>Modos de transferencia de materia</i>	79
2.1.5. <i>Técnicas electroquímicas</i>	80
2.1.5.1. <i>Voltamperometría cíclica</i>	80
2.1.5.2. <i>Amperometría</i>	88
2.1.6. <i>Espectroscopía de Impedancia Electroquímica</i>	89
2.1.6.1. <i>Circuito equivalente de una celda electroquímica</i>	91
2.1.7. <i>Material del electrodo de trabajo</i>	92
2.1.8. <i>Isotermas de adsorción</i>	97
2.2. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS	102
2.2.1. <i>Enzimas y cinética enzimática</i>	102
2.2.2. <i>Peroxidasas y cinética de las peroxidasas</i>	105
2.2.3. <i>Estructura de los biosensores</i>	110
2.2.4. <i>Construcción de un biosensor</i>	112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CAPÍTULO 3: REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS	122
3.1. REACTIVOS	124
3.1.1. <i>Eugenol, isoeugenol y vainillina</i>	124
3.1.2. <i>Soluciones patrones de eugenol, isoeugenol y vainillina</i>	124
3.1.3. <i>Electrolitos soporte</i>	125
□ <i>Soluciones reguladoras de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4</i>	125
□ <i>Ácido perclórico</i>	125
3.1.4. <i>Peroxidasa de soja</i>	125
3.1.5. <i>1-ácido carboxílico adamantano y EDAC</i>	125
3.1.6. <i>Conjugado 1-ácido carboxílico adamantano con la enzima peroxidasa de soja</i>	125
3.1.7. <i>Peróxido de hidrógeno</i>	126
3.1.8. <i>Óxido de grafeno</i>	126
3.1.9. <i>Betaciclodextrina</i>	126
3.1.10. <i>Compósito óxido de grafeno reducido químicamente-betaciclodextrina</i>	126
3.1.11. <i>Nanopartículas de oro</i>	127
3.2. MATERIALES	127
3.2.1. <i>Celda electroquímica de tres electrodos</i>	127

3.2.2. <i>Electrodos de trabajo</i>	127
3.2.2.1. Electroodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente	128
3.2.3. <i>Electrodo de referencia</i>	128
3.2.4. <i>Contra-electrodo o electrodo auxiliar</i>	128
3.2.5. <i>Potenciostatos</i>	128
3.2.6. <i>Medidas espectrofotométricas</i>	128
3.2.7. <i>Microscopio de barrido electrónico</i>	129
3.2.8. <i>Microscopio de fuerza atómico</i>	129
3.3. MÉTODOS	129
3.3.1. <i>Métodos electroquímicos</i>	129
3.3.2. <i>Métodos espectrofotométricos</i>	129
3.3.2.1. Determinación de la constante de acidez aparente de los antioxidantes	129
3.3.2.2. Determinación de la concentración de enzima y de peróxido de hidrógeno	132
3.3.2.3. Cinética enzimática	132
3.3.3. <i>Métodos quimiométricos</i>	132
3.3.3.1. En la generación del óxido de grafeno parcialmente reducido	137
3.3.3.2. En el estudio de la cinética enzimática entre la enzima peroxidasa de soja y los antioxidantes eugenol, isoeugenol y vainillina.	138
3.3.3.3. En el diseño de un biosensor enzimático amperométrico	140
3.3.4. <i>Preparación del biosensor</i>	147
3.3.5. <i>Cuestiones analíticas</i>	149
3.3.6. <i>Otros métodos utilizados</i>	150
Métodos teóricos	150
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	154
4.1. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE EUGENOL, ISOEUGENOL Y VAINILLINA	158
4.1.1. <i>Eugenol</i>	158
4.1.1.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo	158

4.1.1.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente	159
4.1.1.3. Comportamiento electroquímico de eugenol en 1 M HClO ₄	161
<i>4.1.2. Isoeugenol</i>	<i>164</i>
4.1.2.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo	164
4.1.2.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente	165
4.1.2.3. Comportamiento electroquímico de isoeugenol en 1 M HClO ₄	167
<i>4.1.3. Vainillina</i>	<i>170</i>
4.1.3.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo	170
4.1.3.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente	172
4.1.3.3. Comportamiento electroquímico de vainillina en 1 M HClO ₄	174
<i>4.1.4. Comparación de las respuestas electroquímicas de eugenol, isoeugenol y vainillina sobre los diferentes electrodos</i>	<i>175</i>
4.1.4.1. Electrodos de carbono vítreo	175
4.1.4.2. Electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno	176
4.1.4.3. Electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente	177
<i>4.1.5. Elucidación de los mecanismos de reacción electroquímica</i>	<i>178</i>
4.1.5.1. Estudios con respecto al pico de oxidación principal	178
4.1.5.2. Estudios con respecto al par redox IIa/IIc	181
<i>4.1.6. Isoterma de adsorción para eugenol sobre electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente</i>	<i>184</i>
4.1.6.1. Determinación del mejor potencial de acumulación	184
4.1.6.2. Determinación del mejor tiempo de acumulación.	185

4.1.6.3. Estudio de la dependencia de la corriente de pico anódica (Pico I) con el tiempo de acumulación para diferentes temperaturas	188
4.1.6.4 Derivación de las isothermas de adsorción	188
4.2. PROPIEDADES DE LOS DIFERENTES ELECTRODOS DE TRABAJO UTILIZADOS	191
4.2.1. <i>Electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente</i>	191
4.2.2. <i>Caracterización de los electrodos modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente mediante microscopía de fuerza atómica</i>	191
4.2.3. <i>Caracterización de los electrodos modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente mediante espectroscopía de impedancia electroquímica</i>	193
4.2.4. <i>Comparación de la respuesta electroquímica de cada uno de los antioxidantes sobre los diferentes electrodos.</i>	196
4.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ APARENTES DE CADA UNO DE LOS ANTIOXIDANTES Y CINÉTICA ENZIMÁTICA	199
4.3.1. <i>Determinación de las constantes de acidez aparente de los tres antioxidantes</i>	199
4.3.2. <i>Determinaciones cinéticas</i>	204
4.3.2.1. Eugenol	204
4.3.2.2. Isoeugenol	207
4.3.2.3. Vainillina	210
4.3.2.4. Parámetros cinéticos	213
4.4. BIOCENSORES	215
4.4.1. <i>Caracterización de la síntesis del compósito OGRQ-βCD</i>	215
4.4.2. <i>Caracterización del conjugado EPS-ADA</i>	216
4.4.3. <i>Caracterización de las diferentes etapas de armado del biosensor</i>	219
4.4.3.1. <i>Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica y voltamperometría cíclica</i>	219
4.4.3.2. <i>Caracterización mediante SEM-EDS</i>	223
4.4.4. <i>Biosensor para la determinación de peróxido de hidrógeno</i>	226
4.4.4.1. <i>Mejores condiciones de armado del biosensor</i>	226

4.4.4.2. Determinación de peróxido de hidrógeno	227
4.4.4.3. Parámetros estadísticos del biosensor	229
<i>4.4.5. Biosensor para la determinación de eugenol</i>	<i>230</i>
4.4.5.1 Mejores condiciones de armado del biosensor enzimático amperométrico para eugenol	230
4.4.5.2. Elección del mejor potencial de trabajo	232
4.4.5.3. Determinación de eugenol	236
4.4.5.4. Parámetros estadísticos del biosensor	238
4.4.5.5. Muestras reales	238
<i>4.4.6. Blancos de reacción</i>	<i>248</i>
4.4.6.1. Blancos espectrofotométricos	248
4.4.6.2. Blancos electroquímicos	248
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	252
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	256

Índice de figuras

FIGURA		PÁGINA
1.1	<i>Clavo de olor</i>	54
1.2	<i>Principales países productores de clavo de olor (Kamatou y col., 2012.)</i>	54
1.3	<i>Estructura química de EUG</i>	55
1.4	<i>Estructura química de IEUG</i>	60
1.5	<i>Posibles mecanismos de oxidación propuestos para IEUG y EUG por Barratt y Basketter (1992).</i>	63
1.6	<i>Estructura química de VAI</i>	64
2.1	<i>Representación esquemática de un sistema electroquímico</i>	76
2.2	<i>Representación esquemática de la doble capa eléctrica</i>	79
2.3	<i>A) Programa de potencial aplicado al ET en VC. B) Voltamperograma cíclico resultante.</i>	81
2.4	<i>Esquema general de una reacción de electrodo</i>	86
2.5	<i>Voltamperograma cíclico ideal para un par redox superficial, donde ambos el reactivo y el producto de la reacción están adsorbidos sobre la superficie del electrodo.</i>	86
2.6	<i>La impedancia Z graficada como un vector plano, utilizando coordenadas rectangulares y polares.</i>	91
2.7	<i>Circuito equivalente de Randless.</i>	91
2.8	<i>Estructura del grafeno</i>	94
2.9	<i>Estructura simplificada del óxido de grafeno</i>	94
2.10	<i>Reducción de OG a OGR (Jiang y col., 2012)</i>	96
2.11	<i>Esquema que representa la ruta de obtención de los distintos derivados del grafito.</i>	96
2.12	<i>Comportamiento típico obtenido para la velocidad de la reacción enzimática con respecto a la c_s^*</i>	104
2.13	<i>Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk</i>	105
2.14	<i>Estructura esquemática de EPS, obtenida de estudios</i>	106

	<i>cristalográficos, Kamal y Behere, 2003.</i>	
2.15	<i>Esquema del mecanismo ping-pong</i>	107
2.16	<i>Esquema del “mecanismo ping-pong” de las peroxidasas</i>	108
2.17	<i>Componentes de un biosensor. Esquema adaptado de Borgmann y col. (2010)</i>	110
2.18	<i>Esquema que describe las características de los biosensores de primera generación (1^{RA} G), de segunda generación (2^{DA} G) y de tercera generación (3^{RA} G),</i>	112
2.19	<i>Representación de A) βCD y B) OGRQ- βCD</i>	114
2.20	<i>Representaciones de A) adamantano y B) 1-ácido carboxílico adamantano</i>	115
3.1	<i>Diagrama de bloques que representa el algoritmo escrito en MATLAB</i>	130
3.2	<i>Mejor tratamiento y punto óptimo. Región experimental y región de operabilidad.</i>	136
3.3	<i>Esquema de los pasos seguidos para encontrar las mejores condiciones de armado de los biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación H_2O_2 y de EUG</i>	140
3.4	<i>Diagrama de Ishikawa que muestra cuáles son los factores considerados en la construcción del biosensor de H_2O_2.</i>	141
3.5	<i>Diagrama de Ishikawa que muestra cuáles son los factores involucrados en la construcción del biosensor para EUG.</i>	144
3.6	<i>Representación del armado del biosensor</i>	149
4.1	<i>Respuestas voltamperométricas de EUG sobre ECV en diferentes medios de reacción: 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,10 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 10,00 y (—) 12,00. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$</i>	158
4.2	<i>Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para EUG sobre ECV. $v = 0,1 V s^{-1}$</i>	159
4.3	<i>Respuestas voltamperométricas de EUG sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M $HClO_4$ y 0,2 M</i>	160

	SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 10,00 y (—) 12,00. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$. $t_{ac}: 30 min$, $E_{ac} = PCA$.	
4.4	Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y de b) $I_{p,a}$ con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 V s^{-1}$	161
4.5	Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y de b) $I_{p,a}$ con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 V s^{-1}$	161
4.6	Gráfico de $I_{p,a}$ vs v para EUG sobre ECV/OGPRE en 1 M $HClO_4$	162
4.7	Voltamperogramas cíclicos registrados para EUG en 1 M $HClO_4$: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$	163
4.8	Voltamperograma cíclico registrado en 1 M $HClO_4$ con posterioridad a los voltamperogramas cíclicos mostrados en la Figura 4.7. $v = 0,1 V s^{-1}$	163
4.9	Respuestas voltamperométricas de IEUG sobre ECV en diferentes medios de reacción: (—) 1 M $HClO_4$ y 0,2 M SRF pH (—) 2,00 (—) 7,00 (—) 10,00 (—) 12,00. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$.	164
4.10	Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para IEUG sobre ECV. $v = 0,1 V s^{-1}$	165
4.11	Respuestas voltamperométricas de IEUG sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M $HClO_4$ y 0,2 M SRF pH (—) 2,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 11,00. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$. $t_{ac}: 30 min$, $E_{ac} = PCA$.	166
4.12	Dependencia de: $E_{p,a}$ (pico I) (a) y del $E_{p,a}$ (pico III) (b) con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 V s^{-1}$	166
4.13	Dependencia de: $I_{p,a}$ (Pico I) (a) y de $I_{p,a}$ (Pico III) (b) con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 V s^{-1}$	167

- 4.14** Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$. 168
- 4.15** Voltamperograma cíclico registrado en 1 M HClO₄ posteriormente a los voltamperogramas cíclicos mostrados en la Figura 4.14 168
- 4.16** Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄ sobre dos ECV/OGPRE distintos. (—) De -0,5 a 0,8 V y (—) de -0,5 a 0,5 V vs Ag/AgCl. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,100 V s^{-1}$ 169
- 4.17** Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄ sobre dos ECV/OGPRE distintos: (—) de 0 a 0,8 V y (—) de 0 a 0,5 V, (—) 10 voltamperogramas cíclicos consecutivos, entre -0,5 y 0,5 V. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$. 170
- 4.18** Respuestas voltamperométricas de VAI sobre ECV en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO₄, y 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,10 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 9,00 (—) 12,00. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$ 171
- 4.19** Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para VAI sobre ECV. $v = 0,1 V s^{-1}$ 171
- 4.20** Respuestas voltamperométricas de VAI sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO₄, y 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 12,00. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$. t_{ac} : 30 min, $E_{ac} = PCA$. 171
- 4.21** Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y de b) $I_{p,a}$ con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 V s^{-1}$ 173
- 4.22** Voltamperogramas cíclicos registrados para VAI en 1 M HClO₄: (—) Primer barrido cíclico de potencial (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$ 174

4.23	<i>Voltamperogramas cíclicos: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} M$ en $1 M HClO_4$. (—) Primer barrido cíclico y (—) diez barridos cíclicos consecutivos, registrados con posterioridad en una celda conteniendo sólo $1 M HClO_4$ únicamente. $v = 0,1 V s^{-1}$</i>	175
4.24	<i>Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV en $1 M HClO_4$. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$.</i>	176
4.25	<i>Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV/OG en $1 M HClO_4$. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$.</i>	176
4.26	<i>Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV/OGPRE en $1 M HClO_4$. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$.</i>	177
4.27	<i>Mecanismo de reacción electroquímica considerado para los antioxidantes</i>	178
4.28	<i>Mecanismo de reacción considerado para EUG, a partir de lo propuesto por Yildiz y col., 2017.</i>	180
4.29	<i>Voltamperogramas cíclicos registrados sobre ECV/OGPRE en $1 M HClO_4$ para: PO's de 1) EUG, 2) IEUG y 3) VAI. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3} M$. $v = 0,1 V s^{-1}$</i>	182
4.30	<i>a) Voltamperogramas cíclicos registrados para el PO de EUG en $1 M HClO_4$ a diferentes velocidades de barrido. b) Gráfico de $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ en función del log v.</i>	183
4.31	<i>Dependencia de las $I_{p,a}$ (Pico I) con el E_{ac}: ■ (PCA) ▲ (0 V vs Ag/AgCl) ▼ (0,1 V vs Ag/AgCl) ► (0,3 V vs Ag/AgCl) ◀ (0,4 V vs Ag/AgCl) (las barras indican las correspondientes desviaciones estándares para $n = 3$).</i>	185
4.32	<i>Dependencia de las $I_{p,a}$ (Pico I) con el t_{ac} para diferentes</i>	186

	c_{EUG}^* : ■ ($1 \times 10^{-6} M$) ● ($5 \times 10^{-6} M$) ▲ ($1 \times 10^{-5} M$) ▼ ($5 \times 10^{-5} M$) ◀ ($1 \times 10^{-4} M$) ▶ ($5 \times 10^{-4} M$) ◆ ($1 \times 10^{-3} M$) ■ ($5 \times 10^{-3} M$) ● ($1 \times 10^{-2} M$)	
4.33	Dependencia de las Q (Pico I) con el t_{ac} para diferentes c_{EUG}^* : ■ ($1 \times 10^{-6} M$) ● ($5 \times 10^{-6} M$) ▲ ($1 \times 10^{-5} M$) ▼ ($5 \times 10^{-5} M$) ◀ ($1 \times 10^{-4} M$) ▶ ($5 \times 10^{-4} M$) ◆ ($1 \times 10^{-3} M$) ■ ($5 \times 10^{-3} M$) ● ($1 \times 10^{-2} M$).	186
4.34	Dependencia de las $I_{p,a}$ (Pico I) con c_{EUG}^* para un $t_{ac} = 30$ min.	187
4.35	Dependencia de las Q con c_{EUG}^* para un $t_{ac} = 30$ minutos	187
4.36	Dependencia de $I_{p,a}$ (pico I) con t_{ac} para distintas temperaturas: ▲ ($0^\circ C$) ● ($22^\circ C$) ■ ($35^\circ C$). $c_{EUG}^* = 5 \times 10^{-5} M$	189
4.37	Dependencia de c_{EUG}^* con Θ . (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Mejor ajuste obtenido utilizando la ecuación de Freundlich. $t_{ac} = 30$ min.	189
4.38	Gráfico de la ecuación linealizada de Freundlich: $\ln \Theta$ vs $\ln c$. (●) Datos experimentales. (-) Mejor ajuste obtenido	190
4.39	Voltamperogramas cíclicos registrados durante la reducción de OG a OGPRES en $0,2 M$ SRF pH 7,00. $v = 0,052 V s^{-1}$	192
4.40	Imágenes AFM obtenidas para el OG	192
4.41	Imágenes AFM obtenidas para el OGPRES	193
4.42	Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV en $1 \times 10^{-3} M$ de $[Fe(CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M$ KCl. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado	193
4.43	Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV en $1 \times 10^{-3} M$ de $[Fe(CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M$ KCl. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado	194
4.44	Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV/OGPRES en $1 \times 10^{-3} M$ de $[Fe(CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M$ KCl. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado	194

4.45	<i>Circuitos equivalentes que mejor ajustaron a) Circuito de Randless y b) Circuito utilizado por Casero y col. 2012</i>	195
4.46	<i>Voltamperogramas cíclicos de EUG registrados sobre (—) ECV, (—) ECV/OG (—) y ECV/OGPRE, en 1 M HClO₄. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{ac} = 30 \text{ min}$, $E_{ac} = \text{PCA}$</i>	196
4.47	<i>Voltamperogramas cíclicos de IEUG registrados sobre (—) ECV (—) ECV/OG (—) ECV/OGPRE, en 1 M HClO₄. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{ac} = 30 \text{ min}$, $E_{ax} = \text{PCA}$.</i>	197
4.48	<i>Voltamperogramas cíclicos de VAI registrados sobre (—) ECV (—) ECV/OG (—) ECV/OGPRE, en 1 M HClO₄. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{ac} = 30 \text{ min}$, $E_{ax} = \text{PCA}$</i>	197
4.49	<i>Espectros de absorción UV-Visible para EUG en diferentes medios de reacción: 1) 1 M HClO₄, de 2) a 10), 0,2 M SRF pH 2,00; 3,10; 4,20; 5,20; 6,10; 7,00; 8,00; 9,30; 10,00, respectivamente. Espectros 11) y 12) pH = 11,00 y 11,90, respectivamente. $c_{EUG}^* = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$. Celda de cuarzo, camino óptico (b) = 1 cm</i>	200
4.50	<i>Espectros de absorción UV-Visible para IEUG en diferentes medios de reacción. 1) 1 M HClO₄, de 2) a 6) 0,2 M SRF pH's 2,10; 4,00; 6,00; 7,00; 8,00, respectivamente. Espectros 7) y 8) pH's 10,4 y 12,0, respectivamente. $c_{IEUG}^* = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Celda de cuarzo, b = 1 cm</i>	200
4.51	<i>Espectros de absorción UV-Visible de VAI en diferentes medios de reacción. 1) 1 M HClO₄, de 2) a 4), 0,2 M SRF pH's 2,00; 4,00; 6,00, respectivamente. Espectro 5) 0,2 M SRF, pH 7,00; Espectro 6) 0,2 M SRF, pH 8,00; Espectros 7) y 8), 0,2 M SRF pH's 10,40 y 12,00, respectivamente. $c_{VAI}^* = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Celda de cuarzo, b = 1 cm</i>	201
4.52	<i>Variación de A con el pH a $\lambda = 269 \text{ nm}$ para EUG. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste</i>	202

4.53	<i>Variación de A con el pH a $\lambda = 317 \text{ nm}$ para IEUG. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste</i>	202
4.54	<i>Variación de A con el pH a $\lambda = 265 \text{ nm}$ para VAI. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste</i>	203
4.55	<i>Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre EUG y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 6. Tiempos de reacción: de 1) a 7) 0; 11,6; 102,2; 202,2; 412,2; 502,2 y 592,2 s, respectivamente. $c_{EUG}^* = 162 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 379 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$.</i>	204
4.56	<i>Perfiles de c_{EUG}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 6,00. $c_{EUG}^* = 162 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 379 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$</i>	205
4.57	<i>Gráfico de superficie de respuesta para EUG</i>	206
4.58	<i>Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre IEUG y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 8. Tiempos de reacción: de 1) a 9) 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 180 s, respectivamente. $c_{IEUG}^* = 39 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 1131 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$.</i>	207
4.59	<i>Perfiles de c_{IEUG}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 8. $c_{IEUG}^* = 39 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 1131 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$.</i>	208
4.60	<i>Gráfico de superficie de respuesta para IEUG</i>	209
4.61	<i>Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre VAI y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 5,2. Tiempos de reacción: de 1) a 9) 0; 1,4; 6,7; 18,7; 36,7; 60,7; 79,3; 98 y 213,7 s, respectivamente. $c_{VAI}^* = 77 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 16 \text{ }\mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 10$</i>	210

	<i>nM.</i>	
4.62	<i>Perfiles de c_{VAI}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 5,2. $c_{VAI}^* = 77 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 16 \mu M$, $c_{EPS}^* = 10 nM$.</i>	212
4.63	<i>Gráfico de superficie de respuesta para VAI</i>	212
4.64	<i>Espectros de absorción UV-Visible de (—) OG y (—) OGRQ-βCD</i>	215
4.65	<i>Espectros de absorción UV-Visible: a) OG y b) OGRQ-βCD. Al pie de la figura se muestran las correspondientes dispersiones</i>	216
4.66	<i>Espectros de absorción UV-Visible de: a) EPS y b) EPS-ADA. $c_{EPS}^* = 1,55 \times 10^{-4} M$. $c_{EPS-ADA}^* = 3,1 \times 10^{-5} M$</i>	217
4.67	<i>Espectros de absorción UV-Visible 1) EUG y 2) registrados a diferentes tiempos de reacción enzimática en 0,2 M en SRF pH 7. $c_{EUG}^* = 387 \mu M$ $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu M$, $c_{EPS-ADA}^* = 2,5 nM$</i>	218
4.68	<i>Perfiles obtenidos mediante el algoritmo MCR-ALS para la concentración de EUG en función del tiempo cuando la cinética enzimática se realiza con EPS (●) y con EPS-ADA (■).</i>	219
4.69	<i>Gráficos de Nyquist correspondientes a los electrodos a) ECV, b) ECV/OGRQ-βCD, c) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA y d) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu registrados en $1 \times 10^{-3} M$ de $[Fe (CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M KCl$. Las líneas sólidas corresponden a los espectros de impedancia simulados.</i>	220
4.70	<i>Circuitos equivalentes que mejor ajustaron: a) Circuito de Randless y b) Circuito utilizado por Casero y col. 2012</i>	220
4.71	<i>Voltamperogramas cíclicos correspondientes a los electrodos a) ECV, b) ECV/OGRQ-βCD, c) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA y d) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu registrados en $1 \times 10^{-3} M$ $[Fe (CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M KCl$</i>	222

4.72	<i>Imágenes SEM correspondientes a OG (A y C) y a OGRQ (B y D)</i>	223
4.73	<i>Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ-βCD</i>	224
4.74	<i>Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ-βCD/EPs-ADA</i>	225
4.75	<i>Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ-βCD/EPs-ADA/NPsAu</i>	226
4.76	<i>Respuestas amperométricas del biosensor hacia diferentes agregados de H₂O₂. 1) 3 x 10⁻⁵ M, 2) 1 x 10⁻⁴ M, 3) 1,7 x 10⁻⁴ M, 4) 2,5 x 10⁻⁴ M, 5) 3,55 x 10⁻⁴ M, 6) 5 x 10⁻⁴ M, 7) 7 x 10⁻⁴ M, 8) 1 x 10⁻³ M</i>	228
4.77	<i>Curva de calibración correspondiente a las respuestas amperométricas mostradas en la Figura 4.76. En el inserto se muestra el intervalo lineal de la curva de calibración.</i>	228
4.78	<i>Voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en ausencia (—) y en presencia de c_{EUG}[*] = 6 x 10⁻⁴ M (—) en 0,2 M SRF pH 7,00. v = 0,1 V s⁻¹.</i>	233
4.79	<i>Voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en 0,2 M SRF pH 7,00 (—), en presencia de c_{H₂O₂}[*] = 5 x 10⁻⁴ M (—), en presencia de c_{H₂O₂}[*] = 5 x 10⁻⁴ M y c_{EUG}[*] = 6 x 10⁻⁴ M (—) y los barridos consecutivos registrados a continuación de (—) (—). v = 0,1 V s⁻¹.</i>	234
4.80	<i>Medida amperométrica correspondiente al ECV/OGRQ-βCD/NPsAu en presencia de c_{H₂O₂}[*] = 1 x 10⁻⁴ M frente a diferentes agregados de EUG: 1 x 10⁻⁷ M, 1 x 10⁻⁶ M, 1 x 10⁻⁵ M, 5 x 10⁻⁵ M y 1 x 10⁻⁴ M (t = 120, 240, 360, 480 y 600 s. E_a = 0 V.</i>	235
4.81	<i>Medida amperométrica correspondiente al biosensor en ausencia de H₂O₂ frente a diferentes agregados de EUG: 1 x 10⁻⁷ M, 1 x 10⁻⁶ M, 1 x 10⁻⁵ M, 5 x 10⁻⁵ M y 1 x 10⁻⁴ M (t =</i>	236

	1500, 1800, 2100 y 2400 s, respectivamente). $E_a = 0$ V	
4.82	<i>Respuestas amperométricas del biosensor hacia diferentes agregados de EUG. 1) 1×10^{-7} M, 2) 3×10^{-7} M, 3) 5×10^{-7} M, 4) 1×10^{-6} M, 5) 3×10^{-6} M, 6) 5×10^{-6} M, 7) 1×10^{-5} M, 8) 3×10^{-5} M, 9) 6×10^{-5} M, 10) 8×10^{-5} M y 11) 1×10^{-4} M.</i>	237
4.83	<i>Curva de calibración correspondiente a la respuesta amperométrica mostrada en la Figura 4.82. En el inserto se muestra el intervalo lineal de la curva de calibración</i>	237
4.84	<i>Cemento de restauración intermedia</i>	238
4.85	<i>Espectros UV-Visible correspondientes a 0,2 M SRF pH 7(—), muestra (—) y EUG comercial (—) ($c_{EUG} = 3 \times 10^{-4}$ M)</i>	239
4.86	<i>Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real (7×10^{-6} M) y diferentes alícuotas (2-6) de EUG comercial. Finalmente en celda $c_{EUG}^* = 7,5 \times 10^{-6}$ M, 8×10^{-6} M, $8,5 \times 10^{-6}$ M, 9×10^{-6} M y $9,5 \times 10^{-6}$ M de 2) a 6), respectivamente</i>	240
4.87	<i>Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real (3×10^{-6} M) y diferentes alícuotas (2-5) de EUG comercial. Finalmente en celda, $c_{EUG}^* = 3,5 \times 10^{-6}$ M, 5×10^{-6} M, $7,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-5} M de 2) a 5), respectivamente.</i>	242
4.88	<i>Dentolina Fucus</i>	243
4.89	<i>Estructura química de GUA</i>	244
4.90	<i>Voltamperogramas cíclicos de EUG (—), GUA (—) y Muestra (—) registrados sobre la superficie del biosensor en 0,2 M SRF pH 7. c_{EUG}^*, c_{GUA}^* y de $c_{Muestra}^* = 1 \times 10^{-3}$ M.</i>	245
4.91	<i>Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real (3×10^{-6} M) y diferentes alícuotas (2-5) de EUG comercial. Finalmente en celda,</i>	246

- $c_{EUG}^* = 3,5 \times 10^{-6} M, 5 \times 10^{-6} M, 7,5 \times 10^{-6} M, 1 \times 10^{-5} M$ de 2) a 5), respectivamente
- 4.92** Respuestas amperométricas del biosensor ante diferentes agregados EUG (—) y GUA (—). 1 y 3) $5 \times 10^{-6} M$, 2 y 4) $7,5 \times 10^{-6} M$ 247
- 4.93** Espectros UV-Visible en presencia de a) 1) 0,2 M SRF pH 7, 2-6) $c_{EUG}^* = 3 \times 10^{-4} M$ y $c_{H_2O_2}^* = 3 \times 10^{-4} M$ a $t = 10, 120, 300$ y 600 s, respectivamente. b) 1) 0,2 M SRF pH 7, 2-6) $c_{EUG}^* = 3 \times 10^{-4} M$ y $c_{EPS}^* = 4 \times 10^{-4} M$ a $t = 10, 120, 300$ y 600 s respectivamente 248
- 4.94** Respuestas amperométricas de 1) ECV/OGRQ- β CD, 2) ECV/OGRQ- β CD/NPsAu y 3) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA en 0,2 M SRF pH 7,00 ante diferentes agregados de H_2O_2 : $3 \times 10^{-5} M, 7 \times 10^{-5} M, 1 \times 10^{-4} M, 5 \times 10^{-4} M$ y $1 \times 10^{-3} M$ a los 120, 240, 360, 480, 600 y 720 s, respectivamente. $E_a = 0,090$ V vs Ag/AgCl 249
- 4.95** Respuestas amperométricas de 1) ECV/OGRQ- β CD, 2) ECV/OGRQ- β CD/NPsAu y 3) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA en 0,2 M SRF pH 7,00 ante diferentes agregados de EUG: $1 \times 10^{-7}, 5 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6} M, 1 \times 10^{-5}$ y $1 \times 10^{-4} M$ a los 120, 240, 360, 480, 600 y 720 s, respectivamente. $E_a = 0$ V vs Ag/AgCl 250

Índice de tablas

TABLA		PÁGINA
1.1	<i>Resumen de los parámetros estadísticos obtenidos por medio de técnicas cromatográficas y electroquímicas, para la determinación de EUG</i>	59
3.1	<i>Niveles para cada factor en el diseño de Box-Behnken para la optimización de la generación de OGPRES</i>	138
3.2	<i>Niveles seleccionados para cada factor para EUG para el DCC</i>	139
3.3	<i>Niveles seleccionados para cada factor para IEUG para el DCC</i>	139
3.4	<i>Niveles seleccionados para cada factor para VAI para el DCC</i>	139
3.5	<i>Niveles para cada factor en el DFF. Biosensor de H₂O₂</i>	142
3.6	<i>Niveles de los factores significativos en DCC. Biosensor de H₂O₂</i>	143
3.7	<i>Niveles para cada factor en el DFF. Biosensor de EUG</i>	145
3.8	<i>Niveles de los factores significativos en DCC. Biosensor de EUG</i>	147
4.1	<i>Resumen de los valores obtenidos para ΔG_{rel}^o para los diferentes productos posibles generados para EUG, IEUG y VAI, durante el primer barrido anódico de potencial</i>	181
4.2	<i>Valores de los parámetros cinéticos para los PO's de EUG, IEUG y VAI</i>	184
4.3	<i>Mejor circuito y R_{TE} para los diferentes electrodos utilizados</i>	195
4.4	<i>Valores de J y A_e calculados para el ECV y el ECV/OGPRES</i>	198
4.5	<i>K_a^{AP} obtenidas para los antioxidantes a la λ de menor error el ajuste no lineal</i>	203
4.6	<i>Análisis de ANOVA para un modelo de superficie de respuesta lineal obtenido para EUG</i>	207
4.7	<i>Análisis de ANOVA obtenido para un modelo de superficie de respuesta 2FI para IEUG</i>	208

4.8	<i>Análisis de ANOVA obtenido para un modelo de superficie de respuesta 2FI para VAI.</i>	212
4.9	<i>Factores significativos y combinación de factores que maximizan v_i, obtenidos después de la utilización de la metodología MSR</i>	213
4.10	<i>K_M^{AP} determinadas para EUG, IEUG y VAI usando el algoritmo RMC-MCA, y los correspondientes parámetros cinéticos k_1 y k_3</i>	214
4.11	<i>Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRO-βCD</i>	225
4.12	<i>Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRO-βCD/EPs-ADA</i>	225
4.13	<i>Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRO-βCD/EPs-ADA/NPsAu</i>	226
4.14	<i>Análisis de la varianza para el DFF. Factores significativos</i>	230
4.15	<i>Análisis de la varianza para el modelo lineal de la superficie de respuesta</i>	230
4.16	<i>Determinación de EUG en un cemento de restauración intermedia utilizando sólo el líquido</i>	241
4.17	<i>Determinación de EUG en un cemento de restauración intermedia utilizando el líquido y el polvo</i>	243
4.18	<i>Composición de la muestra real “Dentolina Fucus”</i>	244
4.19	<i>Determinación de EUG en Dentolina Fucus</i>	246

Abreviaciones

AFM: imágenes de microscopía de fuerza atómica

ADA: adamantano o 1-ácido carboxílico adamantano

ANOVA: acrónimo en inglés de análisis de la varianza

CD: ciclodextrina

CE: contraelectrodo

CG: cromatografía gaseosa

CoI: compuesto I

CoII: compuesto II

Co-s: co-sustrato

DCC: diseño central compuesto

DFF: diseño factorial fraccionado

DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DVS: descomposición en valores singulares

ECM: error cuadrático medio

ECV: electrodo de carbono vítreo

ECV/OG: electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno

ECV/OGPRE: electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

EDAC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidato

EIE: espectroscopía de impedancia electroquímica

EPC: electrodo de pasta de carbono

EPS: enzima peroxidasa de soja

ER: electrodo de referencia

ERO: especies reactivas derivadas del oxígeno

ERP %: error relativo porcentual

ET: electrodo de trabajo

EtOH: etanol

EUG: eugenol

G: grafeno

GUA: creosota vegetal o guaicol

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HRP: peroxidasa de rábano picante

IEUG: isoeugenol

IUBMB: Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

MSR: metodología de la superficie de respuesta

NPsAu: nanopartículas de oro

OAA: Organización de Agricultura y Alimentos

OG: óxido de grafeno

OGPR: óxido de grafeno parcialmente reducido

OGPRE: óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

OGR: óxido de grafeno reducido

OGRQ: óxido de grafeno reducido químicamente

OGRQ- β CD: compósito formado por óxido de grafeno reducido químicamente y betaciclodextrina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: potencial de circuito abierto

PCAF: potencial de circuito abierto forzado

PIM: polímero impreso molecularmente

PEH: plano externo de Helmholtz

PIH: plano interno de Helmholtz

PM: peso molecular

PO: producto de oxidación

RMC: resolución multivariada de curvas

RMC-MCA: resolución multivariada de curvas-mínimos cuadrados alternantes

SEM: imágenes de microscopía de barrido electrónico

SRF: solución reguladora de fosfatos

VAI: vainillina

VC: voltamperometría cíclica

VOC: voltamperometría de onda cuadrada

VPD: voltamperometría de pulso diferencial

ZOE: eugenolato de zinc

Símbolos

A: absorbancia

a_i^b : actividad en el seno de la solución

A_e : área electroquímica

A: área geométrica

b: camino óptico

$C_{ANTIOXIDANTE}^*$: concentración de antioxidante en solución

$C_{H_2O_2}^*$: concentración de peróxido de hidrógeno en solución

C_{ENZ}^* : concentración de enzima en solución

C_{EPS}^* : concentración de enzima peroxidasa de soja en solución

C_{EUG}^* : concentración de EUG en solución

C_{IEUG}^* : concentración de IEUG en solución

C_{RH}^* : concentración del sustrato reductor en solución

C_{ROH}^* : concentración de ROH en solución

C_{VAI}^* : concentración de VAI en solución

C_{CO-S}^* : concentración de co-sustrato en solución

C_O^* : concentración especie oxidada en solución

C_S^* : concentración de sustrato

D: coeficiente de difusión

D_O : coeficiente de difusión de la especie oxidada

D_R : coeficiente de difusión de la especie reducida

$\Delta E_p : E_{p,c} - E_{p,a}$

$\Delta E_{p/2}$: ancho de pico a la altura media

E: enzima

E : potencial del electrodo

E° : potencial formal del par redox

E_a : potencial aplicado

E_{ac} = potencial de acumulación

EFC: elemento de fase constante

$E_{p,a}$: potencial de pico anódico

$E_{p,c}$: potencial de pico catódico

ES: complejo enzima-sustrato de la reacción enzimática

E_λ : potencial al que se invierte la dirección de barrido de potencial en voltamperometría cíclica

F: constante de Faraday

ΔG_{ads}° : energía libre de Gibbs de adsorción

ΔG_{rel}° : energía libre de Gibbs relativa

g' : cambio la energía de adsorción de las especies (Isoterma de Frumkin)

$(I_{p,a})_0$: corriente de pico anódica con respecto a la línea de base de corriente cero

$(I_\lambda)_0$: corriente a E_λ con respecto al cero de corriente.

$I_{máx}$: corriente máxima de saturación

I : corriente

$\text{Im}(Z)$: componente imaginaria de la impedancia

$I_{p,a}$: corriente de pico anódica

$I_{p,c}$: corriente de pico catódica

ΔI_{EE} : corriente de base

J : densidad de corriente

K_M^{AP} : constante aparente de Michaelis-Menten

K_a^{AP} : constante de acidez aparente

k^0 : constante de velocidad estándar de la transferencia heterogénea

k_1 : constante de velocidad de la primer etapa del ciclo de las peroxidasas

k_2 : constante de velocidad de la segunda etapa del ciclo de las peroxidasas

k_3 : : constante de velocidad de la tercer etapa del ciclo de las peroxidasas

k_1 : constante específica de velocidad de la reacciones directa

k_{-1} : constante específicas de velocidad de la reacciones inversa

k_2 : constante de velocidad para la descomposición del complejo ES

k_s : constante de velocidad heterogénea global

n_a : número de electrones de la etapa de transferencia electrónica determinante de la velocidad global

n : índice de heterogeneidad (Isoterma de Frumkin)

n : número de electrones

O: especie oxidada

P: producto de la reacción enzimática

$Q_{\text{máx}}$: valor máximo de Q

Q : carga eléctrica

Q : segundo producto del mecanismo “ping-pong” de las peroxidasas

q^M : estado eléctrico del sistema a una dada temperatura

r : coeficiente de correlación lineal

R : constante de los gases

R : especie reducida

R_a : rugosidad de la superficie

$\text{Re}(Z)$: componente real de la impedancia

R_S : resistencia de la solución

R_{TE} : resistencia a la transferencia de carga

S : sustrato de la reacción enzimática

T : temperatura

t_{ac} = potencial de acumulación

V_{max} : velocidad máxima para la formación del producto de la reacción catalizada por la enzima

v : velocidad de barrido de potencial

v : velocidad de reacción enzimática

v_i : velocidad inicial de reacción

W : elemento de Warburg

Z : impedancia

β : medida de la capacidad y el promedio de afinidad (Isoterma de Frumkin)

Γ : recubrimiento superficial

Γ_i : cantidad de sustancia i adsorbida sobre el electrodo por unidad de área

ε : coeficiente de extinción molar

λ : longitud de onda

α : coeficiente de transferencia catódico

Θ : fracción de recubrimiento superficial

% CV: coeficiente de variación porcentual

$(1 - \alpha)$: coeficiente de transferencia anódico

CAPÍTULO 1: Antioxidantes Fenólicos

Eugenol, Isoeugenol y Vainillina, los protagonistas

En el capítulo 1...

En este capítulo se hará, en primer lugar, un abordaje acerca de los antioxidantes en general, dando su definición y mostrando los alcances que los mismos pueden poseer en términos de salud y protección frente a la auto-oxidación. Luego, se hará una descripción detallada de eugenol (EUG), isoeugenol (IEUG) y vainillina (VAI). Se describirán sus propiedades físicas y químicas, usos y fuentes de obtención. Finalmente, se llevará a cabo una discusión acerca de los estudios electroquímicos y determinaciones analíticas de los mismos.

1.1. Generalidades

En los años recientes, la alimentación de la población mundial se ha convertido en un tópico de interés por parte de los gobiernos, en un tema central de investigación para la comunidad científica, debido a que ha quedado demostrado que la ingesta de una dieta adecuada rica en nutrientes y en compuestos biológicamente activos está íntimamente relacionada con una mejor calidad de vida y con una notable disminución de enfermedades cardiovasculares, tumorales y neurodegenerativas, entre otras. Dentro de los diversos componentes que debe incluir una dieta equilibrada, se puede citar a un grupo heterogéneo de moléculas denominado “**antioxidantes**” (vitaminas C y D, carotenoides, fenoles y polifenoles) (Tuberoso y col., 2013; Oroian y Escriche, 2015). Muchos estudios han demostrado que los antioxidantes pueden ayudar a prevenir enfermedades, tras reducir el estrés oxidativo en el organismo humano (Chan y col., 2018).

Se entiende por antioxidante a aquel compuesto o sistema capaz de prevenir, retardar o detener la auto-oxidación generada por moléculas biológicas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, en respuesta a las reacciones en cadena iniciadas por especies radicalarias (producidos por el metabolismo celular o en respuesta a factores externos) o por especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) (Arteaga y col., 2012). Las células se protegen del ataque de los radicales libres gracias a la presencia de un buen sistema anti-oxidante (Nisha y col., 2011).

Comparados con los antioxidantes sintéticos, los antioxidantes naturales, como las **hierbas medicinales y las especias dietarias**, que son ricas en **compuestos fenólicos**, son de gran interés debido a sus características seguras y saludables (Navikaite-Snipaitiene y col., 2018; Chan y col., 2018).

Asimi y col. (2013) definen a las especias como “*un grupo de complementos alimenticios, que han sido utilizados a lo largo y a lo ancho del mundo durante cientos de años, con el fin de otorgarle a las comidas sabores, aromas, colores y hasta un toque picante*”. También, otros usos atribuidos a las especias han sido los de su aplicación en perfumería y cosmética.

1.2. Eugenol

1.2.1. El clavo de olor

Si bien el (eugenol) **EUG** se encuentra presente en diversas fuentes, como la nuez moscada y la hoja de laurel, es extraído principalmente de los brotes del **clavo de olor**, de la planta denominada *Eugenia caryophyllata* Thumb (sinónimo de *Syzygium aromaticum*, nombre científico del clavo de olor), perteneciente a la familia de *Myrtaceae* (Prakash y Neelu Gupta, 2005). Esta planta crece en climas tropicales, en suelos ricos en humus arcillosos, así como en suelos latericos (proprios de las regiones cálidas, pobres en sílice pero ricos en hierro y alúmina) (Aguilar-González y López-Malo, 2013).

La especia conocida como “clavo” (Figura 1.1) es originaria de las pequeñas islas Molucas, un archipiélago de Indonesia, conocidas como “las islas de las especias”. Ha sido intercambiado de un extremo del mundo a otro, siendo muy codiciado como mercancía en la Europa medieval, con fines medicinales y culinarios. También, en la antigua china, fue utilizado como especia y fragancia durante más de 2000 años. Medicinalmente, el uso de su aceite para el tratamiento de un dolor de muelas, fue documentado por primera vez en 1640, en Francia (Kamatou y col., 2012).



Figura 1.1. *Clavo de olor.*

Los principales países asiáticos productores de clavo de olor son: Indonesia, Madagascar, Tanzania, India, Sri Lanka y Malasia (Figura 1.2). La recolección de los capullos sin abrir se realiza de forma manual. El árbol florece dos veces al año. Los botones florales tienen, inicialmente, un color pálido, que poco a poco se convierte en verde, para tornar luego a un color marrón. Los clavos son los capullos sin abrir y se cosechan cuando las hojas verdes externas han cambiado de un color verde a amarillo-rosa. Los tallos, las hojas y los botones sin abrir son las partes que se utilizan, principalmente, para la extracción del aceite esencial. En el año 2001, se estimó que la producción anual de aceite de clavo de olor alcanzó las 2000 toneladas y en el año 2006, los valores de mercado bruto alcanzaron los US \$ 30-70 millones anuales (Kamatou y col., 2012; Aguilar-González y López-Malo, 2013).



Figura 1.2. *Principales países productores de clavo de olor (Kamatou y col., 2012.)*

Por otra parte, el aceite de clavo de olor ha sido estudiado y ha resultado ser uno de los antioxidantes naturales más fuertes. Dicha actividad antioxidante ha sido atribuida, principalmente, a EUG (el cual representa un 67 % del aceite esencial) (Navikaite-Snipaitiene y col., 2018).

1.2.2. Propiedades físicas y químicas

EUG ($C_{10}H_{12}O_2$), cuya estructura química se muestra en la Figura 1.3, es un fenol cuyo nombre, según la IUPAC, es 4-allyl-2-metoxifenol. Presenta un grupo metoxi en posición “orto” al grupo oxhidrilo y un grupo alílico en posición “para” al mismo.

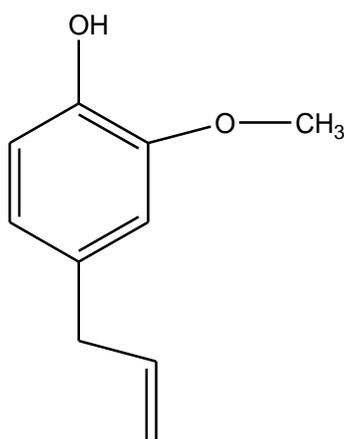


Figura 1.3. Estructura química de EUG

Es un líquido a temperatura ambiente, de color amarillo y consistencia oleosa. Su peso molecular (PM) es de $164,204 \text{ g mol}^{-1}$ y su densidad de $1,0652 \text{ g cm}^{-3}$ (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Es ligeramente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos (PubChem CID: 3314).

1.2.3. Otras propiedades y usos

Son numerosas las propiedades beneficiosas que se le han atribuido a EUG durante el transcurso de los años: actividad anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, vermífugo, anti-inflamatoria, analgésica, antioxidante, anti-cancerígena, anti-mutagénica, anti-genotóxica, entre otras tantas. Es una molécula versátil que está presente en un gran

número de productos que utilizamos a diario, como cosméticos y perfumes populares, helados, whisky, caramelos, enjuagues bucales, preparaciones farmacéuticas y dentales y especias (Lee y col., 2001; Kamatou y col., 2012; Bi y col., 2016).

Con respecto a la capacidad de este compuesto fenólico de “captar” radicales libres, procedentes del daño biológico propio del envejecimiento, es decir, de actuar como antioxidante, Reddy y Lokesh (1994) demostraron que EUG, junto a la cumarina, es capaz de detener la formación de ERO y la oxidación del ión Fe^{2+} . Por su parte, Asimi y col. (2013) concluyeron que, de todos los extractos de especias analizados en su trabajo, aquel que provenía del clavo de olor fue el que obtuvo mayor actividad anti-radicalaria (tanto en agua como en acetato de etilo) frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Además, EUG ha sido utilizado desde hace años por los odontólogos en su forma elemental o bajo la forma de óxido de cinc, como anestésico. A bajas concentraciones, bloquea la actividad del nervio de una manera reversible, como una anestesia local. A altas concentraciones, la conducción del nervio se ve irreversiblemente bloqueada, generando un efecto neurotóxico (Marcowitz y col., 1992).

A pesar de las múltiples aplicaciones encontradas para EUG, puede resultar dañino para el hígado. Una posible sobredosis podría causar una reacción adversa como convulsiones, mareos, diarrea o latidos cardíacos rápidos (Hu y col., 2014). La Organización de Agricultura y Alimentos (OAA), junto a la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan en seres humanos la ingesta diaria de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de EUG. OMS en su informe de 1982 no lo considera cancerígeno (Informe de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1982).

1.2.4. Estudios y determinaciones de eugenol: ¿qué se conoce hasta el momento?

1.2.4.1. Métodos cromatográficos

Se han aplicado varios métodos analíticos, basados en los principios de la cromatografía, para poder determinar EUG. Así, en la bibliografía, es posible encontrar algunos trabajos basados en la cromatografía gaseosa (CG) y en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con algunas variantes.

Se puede mencionar que la CG ha sido utilizada para determinar EUG, junto a cinamaldehído y paeonol, en hierbas medicinales (Yu y col., 2006), obteniéndose un límite de detección (LOD) de 1,82 M para EUG.

Existen, también, registros de uso de CG acoplada a un espectrómetro de masas con micro-extracción en fase sólida (CG-EM-MEFS) para la determinación de EUG en muestras de suero (Schulz y col., 2008). Aquí, el LOD mejoró notablemente, siendo de $1,95 \times 10^{-8}$ M y el correspondiente límite de cuantificación (LOQ) de $2,93 \times 10^{-8}$ M.

Con respecto a HPLC, se ha trabajado en la determinación y separación de EUG, vainillina (VAI), timol y carvacrol, utilizándose un detector electroquímico (Cantalapiedra y col., 2014). Aquí, se obtuvieron un LOD y un LOQ intermedios entre los mencionados anteriormente. Con el detector electroquímico en modo amperométrico los LOD y LOQ fueron $5,91 \times 10^{-8}$ M y $1,95 \times 10^{-8}$ M, respectivamente. Mientras que, en modo coulométrico, el LOD $6,1 \times 10^{-9}$ fue de M y el LOQ de $1,83 \times 10^{-8}$ M.

1.2.4.2. Métodos electroquímicos

El estudio del comportamiento electroquímico de EUG ha recibido un acentuado tratamiento desde el año 2014. Así, se ha trabajado sobre diversas superficies y se han desarrollado técnicas electroanalíticas de diversa naturaleza para su determinación.

Afzali y col. (2014), modificando un electrodo de pasta de carbono con nanopartículas de oro (NPsAu) (EPC/NPsAu), determinaron EUG a través de voltamperometría de pulso diferencial (VPD). El LOD alcanzado para EUG, con este sensor electroquímico, fue de 2×10^{-6} M. Además, se obtuvo un intervalo lineal de concentración de 5×10^{-6} - $2,5 \times 10^{-4}$ M y buenos porcentajes de recuperación, de entre 96 - 99 %, en las medidas en muestras reales.

Lin y col., (2014) también modificaron un ECV, utilizando las mencionadas nanoestructuras dopadas con cobre (ECV/NPsAu@Cu). Así, estudiaron el comportamiento electroquímico de EUG y, luego, lo determinaron en muestras alimenticias, utilizando voltamperometría de barrido lineal. Para este caso, se obtuvo un LOD de $2,56 \times 10^{-7}$ M, con un intervalo lineal de concentración de $5,18 \times 10^{-7}$ - $3,10 \times 10^{-6}$ M.

Feng y col. (2014) desarrollaron un sensor amperométrico trabajando con un ECV modificado con un compósito de grafeno (G), MoS₂ y cloruro de di-allil-di-metil amonio (G-MoS₂- PDDA), material sobre el que se ensamblaron NPsAu. El nanomaterial obtenido fue depositado sobre el electrodo obteniéndose un ECV/NPsAu/PDDA-MoS₂-G. El LOD obtenido fue de $3,6 \times 10^{-7}$ M, mientras que el intervalo lineal de concentración estuvo entre 1×10^{-7} - $4,4 \times 10^{-4}$ M. Además, lograron una reproducibilidad del 3,80 % y una estabilidad de 15 días.

Más recientemente, Saglam y col. (2016) llevaron a cabo la determinación de EUG con un electrodo de lápiz de grafito (ELG). Los LOD y LOQ informados fueron de $8,5 \times 10^{-8}$ M y de 3×10^{-7} M, respectivamente. El intervalo lineal determinado fue de 3×10^{-7} - 5×10^{-5} M. Este es uno de los pocos trabajos en los que se informa la sensibilidad del método ($6,4 \times 10^{-8}$ A M⁻¹).

Yang y col. (2016) diseñaron y construyeron un biosensor basado en un polímero impreso molecularmente (PIM) de poli (p-aminotiofenol-co-p-aminobenzoico) para la determinación electroquímica de EUG. En este trabajo, sobre un ECV, se depositó un compósito de G, nanotubos de carbono y un líquido iónico (G-NTsC-LI), para luego imprimir un polímero y obtener así un ECV/PIM/G-NTsC-LI. En este caso, el LOD obtenido fue de 1×10^{-7} M. El intervalo lineal de concentración fue de 5×10^{-7} - 2×10^{-5} M.

En el año 2017, se estudió el mecanismo de oxidación electroquímica de EUG sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con grafeno (EPC/G) y se analizaron sus aplicaciones para la determinación de este analito en muestras farmacéuticas (Yildiz y col., 2017). Los LOD y LOQ fueron 7×10^{-9} M y $2,3 \times 10^{-8}$ M, respectivamente. El intervalo lineal fue de 1×10^{-7} a 1×10^{-5} M.

No existen hasta el momento, registros bibliográficos acerca de biosensores enzimáticos electroquímicos para la determinación de EUG.

En la tabla 1.1. se resumen algunos de los parámetros estadísticos alcanzados por medio de las técnicas cromatográficas y de los sensores electroquímicos, mencionados anteriormente para la determinación de EUG.

Tabla 1.1. Resumen de los parámetros estadísticos obtenidos por medio de técnicas cromatográficas y electroquímicas, para la determinación de EUG.

Método		LOD/ LOQ (M)	Intervalo Lineal (M)	Muestra	Referencia
CG		$1,82 \times 10^{-6}$	-	Preparación de hierbas medicinales	Yu y col., 2006
CG-EM-MEFS		$1,95 \times 10^{-8} / 2,93 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-11} - 1,21 \times 10^{-8}$	Muestras de suero	Schulz y col., 2008
HPLC	Modo de detección: amperométrico	$5,91 \times 10^{-8} / 1,98 \times 10^{-8}$		Aceites esenciales comerciales	Cantalapiedra y col., 2014
	Modo de detección: coulométrico	$1,83 \times 10^{-8} / 6,1 \times 10^{-9}$			
EPC-NPsAu		2×10^{-6}	$5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-4}$	Agua de rosas	Afzali y col., 2014
ECV-NPsAu@Cu		$2,56 \times 10^{-7}$	$5,18 \times 10^{-7} - 3,10 \times 10^{-6}$	Muestras de especias/ Curry en polvo	Lin y col., 2014
ECV/NPsAu/ G-MoS₂-PDDA		$3,6 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7} - 4,4 \times 10^{-4}$	Perfume y cápsula farmacéutica	Feng y col., 2014
ELG		$8,5 \times 10^{-8} / 3 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$	Disinol líquido de uso odontológico	Saglam y col., 2016
EPC/ G		$7 \times 10^{-9} /$	$1 \times 10^{-7} -$	Pastilla	Yildiz y col.,

	$2,3 \times 10^{-8}$	1×10^{-5}	“Clavo Pastisin (R)- hierba de limón” y Propak Sprey	2017
ECV/PIM/G-NTsC-LI	1×10^{-7}	5×10^{-7} - 2×10^{-5}	Curry en polvo, perfumes y cápsulas	Yang y col., 2016

1.3. Isoeugenol

1.3.1. Propiedades físicas y químicas

Isoeugenol (**IEUG**) ($C_{10}H_{12}O_2$) (Figura 1.4) es un líquido oleoso de color amarillo pálido, a temperatura ambiente, con aroma a clavo de olor. Su nombre, según IUPAC, es 4-propenil-2-metoxifenol. Presenta un grupo metoxi en posición “orto” al grupo oxhidrilo y un grupo propenilo en posición “para” al mencionado -OH. Muestra, a raíz del doble enlace de la cadena lateral, isomería geométrica, pudiéndose presentar en sus formas cis y trans.

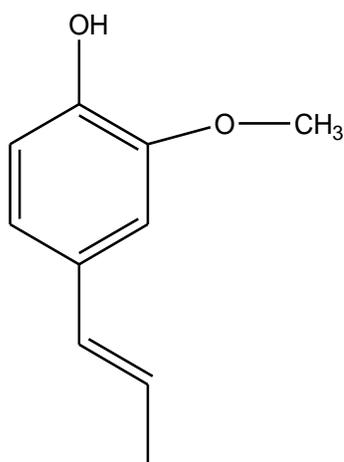


Figura 1.4. Estructura química de IEUG.

Como es posible observar a partir de la Figura 1.4 y, en comparación con la Figura 1.3, IEUG difiere de EUG en la posición del doble enlace en la cadena alifática lateral. Por este motivo, IEUG es posible de ser sintetizado a partir de EUG y puede ser utilizado en la síntesis de VAI.

IEUG posee un PM de $164,204 \text{ g mol}^{-1}$, una densidad de $1,08 \text{ g cm}^{-3}$ (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), Además, es posible mencionar que este fenol es ligeramente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos (PubChem CID: 853433).

1.3.2. Otras propiedades y usos

IEUG se encuentra naturalmente presente en varios aceites esenciales, en conjunto con EUG, tales como ylang ylang (o flor de cananga), champaca y nuez moscada (Atsumi y col., 2005).

IEUG es comúnmente utilizado como fragancia, siendo añadido a productos comerciales. Presenta un perfume más fresco, por lo que es más utilizado en el área de la perfumería que EUG, pero como muestra un olor más dulce y potente que su isómero, su uso en mezclas se encuentra restringido a bajos niveles (Barratt y Basketter, 1992). Al tratarse de un significativo sensibilizador y alérgeno dermatológico, la industria de las fragancias desde 1998 ha restringido a 200 ppm (partes por millón) la cantidad permitida (www.drugbank.ca).

También se ha utilizado en detergentes, jabones, ambientadores y productos alimenticios (Finfik y col., 2011) y presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria (Atsumi y col., 2005).

1.3.3. Estudios electroquímicos

Existen pocos trabajos donde se lleve a cabo una caracterización electroquímica para IEUG. En los primeros registros encontrados, Iguchi y col. (1979) desarrollaron un estudio voltamperométrico y coulométrico de EUG y compuestos relacionados, entre los que se encontraba IEUG, en sus formas cis y trans. Tales estudios se realizaron sobre electrodos de carbono vítreo en metanol.

Muchos años después, Melles y col. (2013) generaron electroquímicamente los productos de oxidación de EUG y IEUG. Según estos autores, “para su sorpresa” EUG e IEUG difirieron en su comportamiento de oxidación. IEUG exhibió la formación de quinonas y metilenquinonas, a partir de especies alquiladas y dealquiladas, respectivamente. Mientras que EUG solamente mostró la formación de quinonas, después de la dealquilación.

Wang y col. (2015) investigaron la oxidación electroquímica de EUG e IEUG, entre otros 4-allyl y 4-propenyl benzenos, sobre EPC y de platino en acetonitrilo con perclorato de litio como electrolito soporte. Estos autores plantean que los grupos oxidativos voltamperométricos donantes de electrones (por ejemplo, oxhidrilo y metoxi) presentan influencia sobre el proceso de oxidación, facilitando el desarrollo del mismo.

Melles y col., (2013) formularon las premisas indicadas anteriormente en base a lo explicado por Barratt y Basketter (1992) acerca de los posibles mecanismos de reacción de compuestos fenólicos. Estos autores trabajaron acerca de los procesos de sensibilización de la piel. En este contexto, IEUG puede oxidarse a través de: el mecanismo de “poison ivy”, el radicalario fenólico y el radicalario bencílico. Mientras que EUG sólo puede hacerlo por medio de los dos primeros (Figura 1.5). El mecanismo de “poison ivy” involucra la demetilación del o-metoxifenol (1), para dar el correspondiente catecol (2), seguido de la oxidación a la o-quinona (3). El mecanismo radicalario fenólico se inicia con la abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo oxhidrilo del fenol (4). Los radicales libres que se forman reaccionan a través de sus formas resonantes, principalmente en la posición orto. El mecanismo radicalario bencílico se vuelve una posibilidad cuando las estructuras resonantes del radical se pueden extender sobre dos átomos de carbono conjugados de la cadena lateral, como es el caso de IEUG. Esto origina una metilenquinona (6), posiblemente responsable de las discrepancias en el comportamiento electroquímico entre IEUG y EUG.

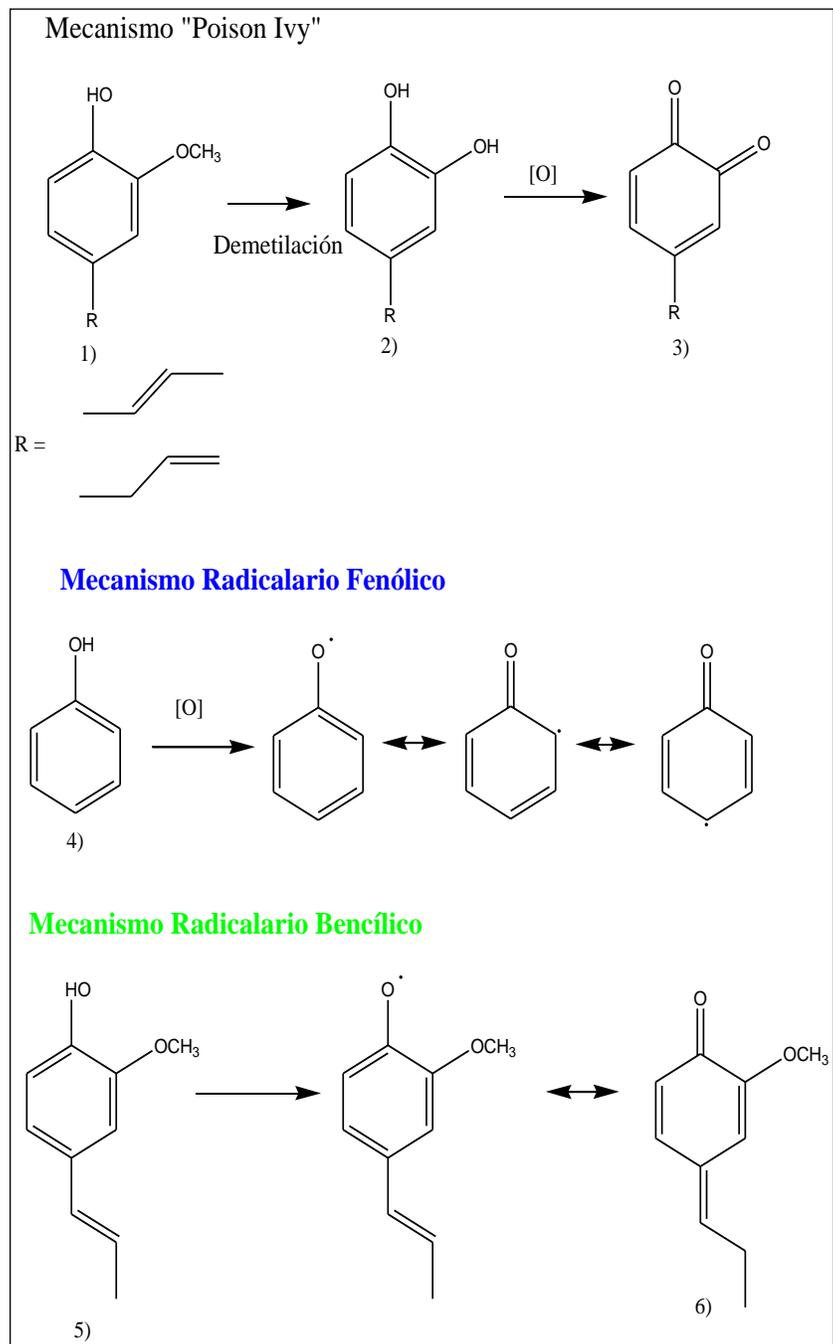


Figura 1.5. Posibles mecanismos de oxidación propuestos para IEUG y EUG por Barratt y Basketter (1992).

1.4. Vainillina

1.4.1. Propiedades físicas y químicas

Vainillina (VAI) o 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído cuya estructura química se muestra en la Figura 1.6, es un orto-metoxi-fenol que presenta un grupo aldehído en posición para al grupo oxhidrilo del fenol. Su fórmula molecular es $C_8H_8O_3$ y su PM es $152,149 \text{ g mol}^{-1}$.

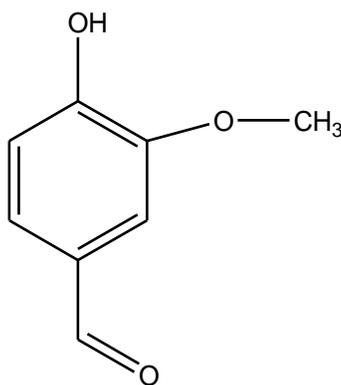


Figura 1.6. Estructura química de VAI.

Desde un punto de vista físico, VAI es un sólido a temperatura ambiente, que se presenta en forma de “agujas” blancas o ligeramente amarillas y posee un olor dulce (PubChem CID: 1183).

1.4.2. Otras propiedades, usos y fuentes

VAI es un agente aromatizante importante, ampliamente utilizado como fijador de perfumes o aditivos en cosméticos, comida, medicina, etc. (Wu y col., 2017). La demanda anual, a nivel mundial, es de aproximadamente 15.000 toneladas. De ese total, sólo el 1 % es extraído de la vainilla natural. Además, VAI puede ser obtenida por cultivo de células (*Vanilla planifolia* y *Capsicum frutescens*), champiñones, bacterias y levaduras, para modificar precursores, tales como EUG, IEUG o alcohol vainillínico, ácido ferúlico, alcoholes de coniferilo y veracilo, y organismos fermentables (Giraud y col., 2014).

Más allá del amplio uso de VAI, su consumo diario debe estar regulado para no perjudicar la salud humana. De acuerdo a la OAA, la dosis diaria de VAI debe ser menor a 10 mg kg^{-1} (FAO Nutrition Meetings Resort, 1967).

1.4.3. Estudios electroquímicos

En cuanto al comportamiento electroquímico y al desarrollo de sensores electroquímicos existen, en los últimos años, diversos experimentos para la determinación de VAI sobre diferentes superficies.

Bettazzi y col. (2006) desarrollaron un sensor electroquímico descartable para la detección de VAI. Estos estudios se basaron en el uso de la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) y determinaron un LOD de $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ para VAI. El método fue aplicado para la detección de VAI en extractos concentrados de vainilla natural y, en productos finales, como el yogurt.

Shang y col. (2014) trabajaron con un ECV modificado con un compuesto de G y nanopartículas de oro-paladio. Bajo las condiciones experimentales, se obtuvo un intervalo lineal de concentración de $1 \times 10^{-7} - 7 \times 10^{-6} \text{ M}$ y otro de $1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4} \text{ M}$, con sensibilidades de $1,6 \times 10^{-6}$ y $1,7 \times 10^{-7} \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cada intervalo, respectivamente. El LOD fue de $2 \times 10^{-8} \text{ M}$. El sensor se utilizó exitosamente en la detección de VAI en té de vainillina y muestras de galletitas.

Deng y col. (2015) trabajaron con un electrodo de pasta de acetileno modificado con un compuesto de G y polivinil pirrolidona. La curva de calibración mostró tres regiones lineales ($2 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-6}$, $2 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5}$ y $4 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$). El LOD fue de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$.

En 2017, Wu y col. desarrollaron el primer biosensor electroquímico, utilizando PIM, nanotubos de carbono de pared simple y múltiple. La sensibilidad obtenida para este biosensor fue de $1,22 \text{ A M}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ y el LOD fue de $0,1 \text{ M}$. Se detectó VAI en muestras reales (galletitas, tortas y té de leche) con resultados satisfactorios.

En todos los trabajos anteriormente descritos, las medidas electroquímicas se basaron en la posibilidad que presenta el grupo $-\text{OH}$ del fenol de ser oxidado, sobre las diferentes superficies. Pero, cabe recordar que VAI presenta en su estructura un grupo aldehído, el cual es susceptible de ser reducido. Por esto, también, existe en bibliografía

evidencia de trabajos donde estudió la reducción electroquímica de VAI sobre diferentes electrodos y medios de reacción (Chadraserana y Krishnan, 1992; Li y col., 2015; Lee y col., 2016).

Referencias Bibliográficas

26° Informe del Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimenticios. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1982.

Afzali, D., S. Zarei, F. Fathirad, A. Mostafavi, “Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol”, *Mater. Sci. Eng. C* **43** (2014) 97–101.

Agular-Gonzalez, A. E. y A. Lopez-Malo, “Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos”, *Temas selectos de ingeniería de alimentos* **7** (2013) 35-41.

Arteaga, J. F., M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez-Mellado, “Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles”, *Molecules* **17** (2012) 5126–5138.

Asimi, O. A., N. P. Sahu, A. K. Pal, “Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*”, *J. Med. Plants Res.* (2013) **7** 1907–1915.

Atsumi, T., S. Fujisama, K. Tonosaki, “A comparative study of the antioxidant prooxidant activity of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidant conditions”, *Toxicol. in Vitro* **19** (2005) 1025-1033.

Baratt, M., D. Basketter, “Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds”. *Contact Derm.* **27** (1992) 98-104.

Bettazzi, F., I. Palchetti, S. Sisalli, M. Mascini, “A disposable electrochemical sensor for vanillin detection”, *Anal. Chim. Acta* **555** (2006) 134-138.

Cantalapiedra, A., M. J. Gismera, M. T. Sevilla, J. R. Procopio, “Sensitive and selective determination of phenolic compounds from aromatic plants using an electrochemical detection coupled with HPLC method”, *Phytochem. Anal.* **25** (2014) 247-254.

Chan C., G. Ren-You, S. Nagendra, C. Harold, “Polyphenols from selected dietary spices and medicinal herbs differentially affect common food-borne pathogenic bacteria and lactic acid bacteria”, *Food Chem.* **92** (2018) 437-443.

Chandrasekaran, M., M. Noel, V. Krishnan, “Glassy carbon surface effects on the electroreduction of aromatic carbonyl compounds. Part III: Vanillin”, *J. Appl. Electrochem.* **22** (1992) 1072-1076.

Deng, P., Z. Xu, R. Zeng, C. Ding, “Electrochemical behavior and voltammetric determination of vanillin based on an acetylene black paste electrode modified with graphene-polyvinylpyrrolidone composite film”, *Food Chem.* **180** (2015) 156–163.

FAO Nutrition Meetings Report, Series No. 44A. (1967). WHO/Food Add./68.33.

Feng, Q., K. Duan, X. Ye, D. Lu, Y. Du, C. Wang, “A novel way for detection of eugenol via poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-MoS₂ nano-flower fabricated electrochemical sensor”, *Sens. Actuators B Chem.* **192** (2014) 1–8.

Findik, E., M. Ceylan, M. Elmastas, “Isoeugenol-based novel potent antioxidants: Synthesis and Reactivity”, *Eur. J. of Med. Chem.* **46** (2011) 4618-4624.

Giraud, W., M. Mirabel, M. Comtat, “Electroanalysis may be used in Vanillin Biotechnological Production”, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172** (2014) 1953–1963.

Iguchi, M., A. Nishiyama, Y. Ferada, S. Yamamura, “Voltammetric and coulometric studies of eugenol and related compounds”, *Anal. Letters* **12** (1979) 1079-1087.

Kamatou, G. P., I. Vermaak, A. M. Viljoen, “Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A review of remarkable and versatile molecule”, *Molecules* **17** (2012) 6953-6981.

Lee M., K.Y., A. Paterson, J. Piggot, “Origins of flavours in whiskies and a revised flavour Wheel: a review”, *J. I. Brewin* **107** (2001) 286-313.

Lee, J., S. Lauw, R. Webster, “The electrochemical study of vanillin in acetonitrile”, *Electrochim. Acta* **211** (2016) 533–544.

Li, J., H. Feng, J. Li, J. Jiang, Y. Feng, L. He, D. Qian, “Bimetallic Ag-Pd nanoparticles-decorated graphene oxide: a fascinating three-dimensional nanohybrid as an efficient electrochemical sensing platform for vanillin determination”, *Electrochim. Acta* **176** (2015) 827–835.

Lin, X., Y. Ni, S. Kokot, “Electrochemical mechanism of eugenol at a Cu doped gold nanoparticles modified glassy carbon electrode and its analytical application in food samples”, *Electrochimica Acta* **133** (2014) 484–491.

Markowitz, K., M. Moynihan, M. Liu, S. Kim, “Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol”, *Oral surg. oral med. oral pathol.* **73** (1992) 729-37.

Melles, D., T. Vielhaber, A. Baumman, R. Zazzeroni, U. Karst, “In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B* **913-914** (2013) 106-112.

Navikaite-Snipaitiene, V., L. Ivanauskas, V. Jakstas, N. Ruegg, R. Rutkaite. E. Wolfram, S. Yildirim, “Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef”, *Meat Science* **45** (2018) 9-15.

Nisha, K., R. K. Deshwal, “Antioxidants and their protective action against DNA damage”, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **3** (2011) 28-32.

Oroian, M., I. Escriche, “Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis”, *Food Res. Int.* **74** (2015) 10–36.

Prakash, P., N. Gupta, “Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review”, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **49** (2005) 125-131.

Reddy, C. P., B. R. Lokesh, “Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron”, *Mol. Cell. Biochem.* **137** (1994) 1–8.

Saglam, O., D. G. Dilgin, B. Ertek, Y. Dilgin, “Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode”, *Mater. Sci. Eng. C* **60** (2016) 156–162.

Schulz, K., K. Schlenz, S. Malt, R. Metasch, W. Romhild, J. Drebler, D. W. Lachenmeir, “Headspace solid-phase microextraction-gaschromatography-mass spectrometry for the quantitative of the characteristic flavouring agent eugenol in serum samples after enzymatic cleavage to validate post-offence alcohol drinking claims”, *J. Chromatogr. A* **1211** (2008) 113-119.

Shang, L., F. Zhao, B. Zeng, “Sensitive voltammetric determination of vanillin with an AuPd nanoparticles graphene composite modified electrode”, *Food Chem.* **151** (2014) 53-57.

Tuberoso, C. I. G., M. Boban, E. Bifulco, D. Budimir, F. M. Pirisi, “Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey”, *Food Chemistry* **140** (2013) 686-691.

Wang, L-H., C-L. Chang Y., Y-C Hu, “Electrochemical oxidation of fragrances 4-allyl and 4-propenylbenzenes on platinum and carbon paste electrodes”, *Croat. Chem. Acta* **88** (2015) 35-42.

Wang, X., X. Zhang, “Electrochemical co-reduction synthesis of graphene/nano-gold composites and its application to electrochemical glucose biosensor”, *Electrochim. Acta* **112** (2013) 774–782.

Wu. W., L. Yang, F. Zhao, B. Zeng, “A vanillin electrochemical sensor based on molecularly imprinted poly(1-vinyl-3-octylimidazolehexafluoridephosphorus)–multi walled carbon nanotubes@polydopamine–carboxyl single-walled carbon nanotubes composite”, *Sens. Actuat. B* **239** (2017) 481–487.

www.drugbank.ca

Yang, L., F. Zhao, B. Zeng, “Electrochemical determination of eugenol using three-dimensional molecularly imprinted poly (p-aminothiophenol-co-p-aminobenzoic acids) film electrode”, *Electrochim. Acta* **210** (2016) 293-300.

Yildiz, G., Z. Aydogmus, M. Cinar, F. Senkal, T. Ozturk, “Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical applications to pharmaceutical analysis”, *Talanta* **173** (2017) 1-8.

Yu B., S. Lai, Q. Tan, “Simultaneous determination of cinnamaldehyde, eugenol and paeonol in traditional chinese medicinal preparations by capillary GC-FID”, *Chem. Pharm. Bull.* **54** (2006) 114-116.

CAPÍTULO 2: Fundamentos teóricos

*Bases sobre las que se apoya el desarrollo de
nuevos conocimientos*

En el capítulo 2...

Este capítulo se divide en dos partes. En la sección 2.1 se desarrollarán los principales aspectos que conciernen al trabajo en electroquímica: cuestiones generales a considerar en un proceso electroquímico, técnicas electroquímicas, materiales de electrodo de trabajo e isothermas de adsorción.

En la segunda parte de este capítulo, sección 2.2, se abordarán los biosensores electroquímicos. En particular, se hará hincapié en los del tipo enzimático, en las principales características de la cinética enzimática, especialmente la de las enzimas peroxidasas. Finalmente, se describirán aquellos elementos que son partícipes de la construcción de un biosensor.

2.1. Aspectos electroquímicos

2.1.1. Cuestiones generales

La **electroquímica** es la rama de la Química encargada de estudiar la interrelación que existe entre la electricidad y los cambios químicos. La atención se centra en los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de una interfaz que se establece entre dos fases químicas (Bard y Faulkner, 2001). La principal característica de un sistema electroquímico es que por la interfaz fluye una corriente producida por iones (aniones y/o cationes) y electrones. Lo más frecuente es que una de las fases sea un metal (o semiconductor), donde tendríamos un electrodo (Fase I) y la otra fase es, por lo general, líquida, donde se encuentra el sustrato a estudiar, el cual no necesariamente tiene que ser iónico (Fase II) (Figura 2.1).



Figura 2.1. *Representación esquemática de un sistema electroquímico.*

Los procesos electroquímicos tienen lugar en la interfaz *electrodo-solución* y se desarrollan en **celdas electroquímicas**, las cuales están formadas por, al menos, dos electrodos y una solución electrolítica. Uno de esos electrodos responde al (o a los) analito/s o “target/s” y es denominado **electrodo indicador o de trabajo (ET)**. El segundo es el **electrodo de referencia (ER)**, de potencial constante (es decir, independiente de las propiedades de la solución) (Wang, 2003). Su uso surge de la imposibilidad de estudiar una interfaz aislada, debido a uno de los fenómenos fundamentales de la física, que consiste en la imposibilidad de medir el potencial en un punto determinado. Es por esto que se recurre a un sistema de referencia. Resulta posible así medir una diferencia de potencial entre el ET y el ER. Esa medida de potencial da una medida de la energía disponible para la transferencia electrónica entre los electrodos. A través de una fuente de potencial externa es posible variar el potencial entre los electrodos. Esa variación de potencial produce un flujo de corriente a través de un circuito externo por la interfaz electrodo/solución a medida que la reacción ocurre. Dependiendo de la dirección en que se varíe el potencial (hacia valores más positivos o hacia valores más negativos con respecto a un potencial de equilibrio), se producirá la oxidación o la reducción, respectivamente, del analito de interés. El uso de un tercer electrodo, el **contra-electrodo (CE)**, se vuelve necesario para la disminución de la caída óhmica no compensada, la cual es producto del paso de corriente entre el ET y el ER.

En un sistema electroquímico, además de las variables convencionales a controlar en un sistema fisicoquímico (composición: solutos, solventes, pH; temperatura, presión y tiempo), se deben considerar las variables eléctricas: **diferencia de potencial en la interfaz, corriente eléctrica, tiempo y carga eléctrica.**

La implementación de técnicas electroquímicas implica el manejo de potencial, corriente y tiempo. Potencial y corriente no pueden variar simultáneamente; siempre se condiciona una y la otra evoluciona según las características electroquímicas del sistema en estudio.

2.1.2. Procesos faradaicos y no faradaicos

Cuando un fenómeno electroquímico ocurre, siempre se pueden distinguir dos tipos de procesos físico-químicos y se vuelve necesario diferenciar el origen de ambos fenómenos.

Un proceso **faradaico** (llamado así porque se encuentra gobernado por la Ley de Faraday, $Q = n \times N \times F$, donde n representa el número de electrones del proceso, N es el número de moles de la especie electroactiva que reaccionan y F es la constante de Faraday, 96.484,6 C/mol) es aquel donde la corriente que circula se debe al *flujo de electrones* a través de la interfaz, producto de una oxidación o reducción.

Si bien el interés, por lo general, está centrado en la corriente faradaica, los fenómenos **no faradaicos** siempre están y suelen ser relevantes en algunos estudios. Este tipo de fenómenos se asocian con la adsorción o desorción de iones sobre la superficie del electrodo, debido a cambios en la composición de la solución o a cambios en el potencial eléctrico de la interfaz. Se generan corrientes no faradaicas (también llamadas corrientes capacitivas o de blanco) producto del proceso conocido como “cargado de la doble capa eléctrica” (Bard y Faulkner, 2001).

2.1.3. Doble capa eléctrica

La **doble capa eléctrica** es el arreglo de partículas cargadas y/o dipolos orientados que existen en todo material de interfaz. En electroquímica, dicha capa refleja las zonas iónicas formadas en la solución para compensar el exceso de carga en el electrodo (q_e). Un electrodo cargado positivamente atrae una capa de iones negativos (y viceversa). Ya que la interfaz debe ser neutra, $q_e + q_s = 0$ (donde q_s es la carga de los iones en la solución cercana). En concordancia, una contra-capas está hecha de iones con carga opuesta a la del electrodo (Wiley, 2003).

En la Figura 2.2 se muestra una representación esquemática de la doble capa eléctrica. La capa interna (la más cercana al electrodo), conocida como el plano interno de Helmholtz (**PIH**), contiene moléculas de solvente e iones adsorbidos específicamente. La siguiente capa, el plano externo de Helmholtz (**PEH**), refleja los planos imaginarios que pasan por el centro de los iones solvatados en su aproximación más cercana a la superficie. Los iones solvatados están adsorbidos de un modo no específico y son atraídos

hacia la superficie por fuerzas coulombicas. Las dos capas de Helmholtz representan la **capa compacta**. La capa externa, más allá de la capa compacta, hace referencia a la **capa difusa** (capa de Gouy), es una región tridimensional de iones dispersos que se extiende desde el PEH al seno de la solución (Wiley, 2003).

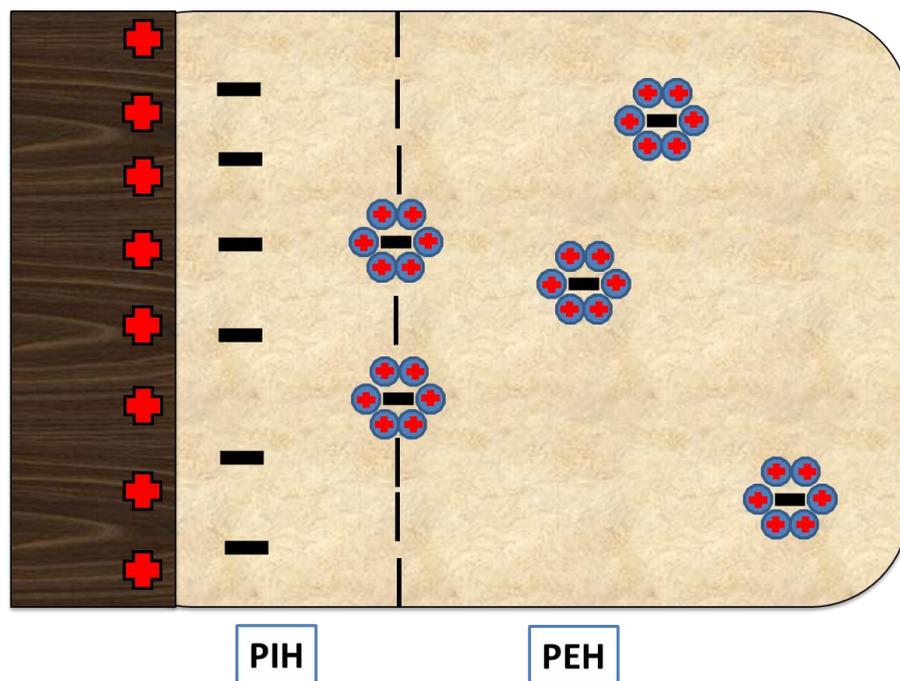


Figura 2.2. Representación esquemática de la doble capa eléctrica.

2.1.4. Modos de transferencia de materia

El transporte de la especie electroactiva desde el seno de la solución a la interfaz puede darse a través de tres modos (Wang, 2003):

Difusión: movimiento espontáneo de la materia bajo la influencia de un gradiente de concentración (es decir, desde regiones de altas concentraciones a bajas concentraciones) con el fin de minimizar estas diferencias.

Convección: transporte de materia hacia el electrodo por un movimiento físico; tal flujo de fluido ocurre con agitación de la solución o con la rotación o vibración del electrodo (es decir, convección forzada) o por un gradiente de densidad (convección natural).

Migración: movimiento de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico (la carga es transportada a través de la solución por los iones, de acuerdo a su número de transporte).

La convección puede ser minimizada tomando la precaución de no agitar la solución, mientras que la migración puede serlo mediante la utilización de un electrolito soporte, es decir una sustancia no electro-activa en el intervalo de potencial de interés y que se encuentra en una mayor concentración que la molécula bajo estudio. Dicho electrolito soporte es el encargado de la migración iónica y permite también aumentar la conductividad de la solución y mantener la fuerza iónica constante.

2.1.5. Técnicas electroquímicas

Las técnicas potencioestáticas son aquellas donde se trabaja a potencial controlado y se obtiene una respuesta en corriente. En realidad, se aparta al electrodo de trabajo un tiempo de su potencial de equilibrio, o sea que se le aplica una perturbación eléctrica según una función conocida en el tiempo ($E = f(t)$). Según la perturbación aplicada, se tendrá una técnica electroquímica diferente.

2.1.5.1. Voltamperometría cíclica

La **voltamperometría cíclica** (VC) se ha convertido en una técnica popular para estudios electroquímicos iniciales en sistemas nuevos y ha probado ser bastante útil para obtener información acerca de reacciones de electrodo complicadas (Bard y Faulkner, 2001). La particularidad que presenta la VC es que sobre el ET se aplica un programa de potencial, donde éste se barre linealmente con el tiempo (Figura 2.3 A).

Considerando la siguiente reacción de reducción: $O + ne^- \rightarrow R$, se parte de un potencial donde no existe reacción faradaica, bastante más positivo que $E^{0'}$ (potencial formal del par redox) y se barre el mismo en sentido negativo (proceso catódico o de reducción). Cuando el potencial del electrodo alcanza un valor cercano al $E^{0'}$ comienza a producirse la reducción y a circular una corriente faradaica. A medida que el potencial continúa haciéndose más negativo, la concentración de O sobre la superficie del electrodo decae, luego el flujo de O hacia la superficie y la corriente crecen. A medida que el

potencial pasa el $E^{0'}$, la concentración superficial decae prácticamente a cero, la transferencia de masa de O hacia la superficie alcanza su máxima velocidad y luego disminuye según lo predicho por la ecuación de Cottrell (Bard y Faulkner, 2001). Lo que se observa es una curva corriente-potencial en forma de pico (Figura 2.3 B). Cuando se invierte el barrido de potencial (E_{λ}) a un $t = \lambda$, ahora en dirección positiva (proceso anódico o de oxidación), en las cercanías del electrodo hay una gran concentración de R. Si la cupla redox es química y electroquímicamente reversible, R es re-oxidado a O, fluyendo una corriente anódica $R \rightarrow O + ne^{-}$. Esta corriente inversa tiene una forma de pico similar al pico directo por, esencialmente, las mismas razones.

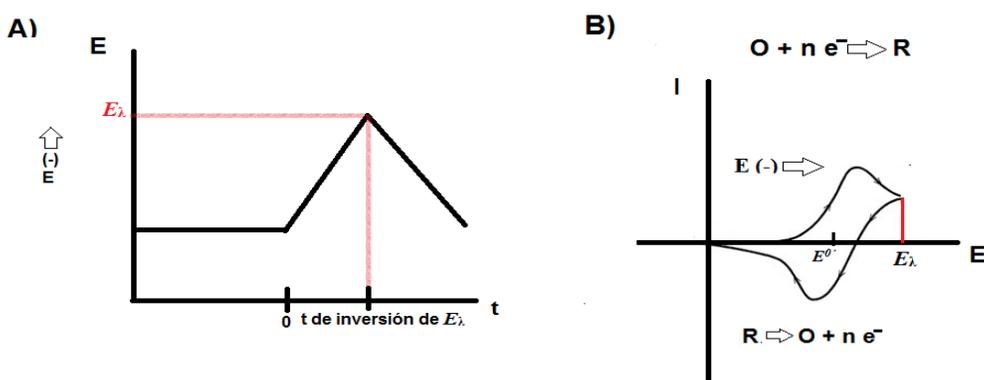


Figura 2.3. A) Programa de potencial aplicado al ET en VC. B) Voltamperograma cíclico resultante.

Los voltamperogramas cíclicos se caracterizan por varios parámetros importantes. Los valores de las corrientes de pico catódica ($I_{p,c}$) y anódica ($I_{p,a}$), los potenciales de pico catódico ($E_{p,c}$) y anódico ($E_{p,a}$), proveen las bases para aplicar los criterios de diagnóstico desarrollados por Nicholson y Shain (1964) (Wang, 2003). A continuación, se hará una discusión acerca de las diferentes situaciones que se pueden presentar según la naturaleza del sistema en estudio.

Sistemas difusionales. Procesos Reversibles.

Para una cupla redox reversible $O + ne^- \rightleftharpoons R$, asumiendo difusión lineal semi-infinita y donde sólo O está presente inicialmente en solución, la corriente de pico está definida por la siguiente ecuación (Randles-Sevick, 1948; Bard y Faulkner, 2001):

$$I_{p,c} = 0,4463 \left(\frac{F^3}{RT}\right)^{1/2} n^{3/2} A D_R^{1/2} c_O^* v^{1/2} \quad (2.1)$$

o a 25°C:

$$I_{p,c} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_O^{1/2} c_O^* v^{1/2} \quad (2.2)$$

donde n : es el número de electrones que intervienen en el proceso redox; A : área del electrodo (cm^2); c_O^* : concentración (mol cm^{-3}); D_O : coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); v : velocidad de barrido del potencial (V s^{-1}).

De acuerdo a la ecuación 2.2, la corriente de pico es directamente proporcional a la concentración y se incrementa con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Wang, 2003). Además, la relación entre las $I_{p,c}$ e $I_{p,a}$ es igual a 1 para un par reversible simple, con un producto estable, independientemente de la velocidad de barrido (para $E_\lambda > 35/n$ mV después del $E_{p,c}$) (Bard y Faulkner, 2001). Esta relación se ve fuertemente afectada por la presencia de reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial (SchwarzandI y Shain, 1966; Bard y Faulkner, 2001). Así:

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{I_{p,c}} + \frac{0,485 (I_\lambda)_0}{I_{p,c}} + 0,086 \quad (2.3)$$

donde $(I_{p,a})_0$ es la corriente de pico anódica con respecto a la línea de base de corriente cero y $(I_\lambda)_0$ es la corriente a E_λ , también con respecto al cero de corriente.

La posición de los picos sobre el eje del potencial (E_p), se relacionan con el $E^{0'}$. El mismo se sitúa entre el $E_{p,c}$ y el $E_{p,a}$:

$$E^{o'} = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad (2.4)$$

El valor de la diferencia que existe entre los potenciales de pico permite inferir el número de electrones involucrados en la reacción redox para un proceso nernstiano:

$$\Delta E_p = E_{p,c} - E_{p,a} = \frac{0.059}{n} V \quad (2.5)$$

Tanto el $E_{p,c}$ como el $E_{p,a}$ no dependen de la velocidad de barrido.

Sistemas difusionales. Procesos irreversibles.

Se definen como procesos de electrodo irreversibles (o procesos activados) a aquellos procesos donde la corriente está limitada por la velocidad de la transferencia de carga. En los voltamperogramas cíclicos de procesos irreversibles se puede observar que los picos referentes al proceso de reducción y de oxidación se reducen en tamaño y se encuentran más separados con respecto a lo que es un proceso reversible (Wang, 2003). Aquí el potencial de pico está dado por la siguiente ecuación (Bard y Faulkner, 2001):

$$E_{p,c} = E^{o'} - RT/\alpha n_a F \left[0,78 - \ln \frac{k^o}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (2.6)$$

donde α es el coeficiente de transferencia catódico y n_a el número de electrones de la etapa de transferencia electrónica determinante de la velocidad global. Aquí (a diferencia de un proceso reversible) el potencial de pico depende de la velocidad de barrido y de k^o (constante de velocidad estándar de la transferencia heterogénea).

En el caso de un proceso activado, la corriente de pico está dada por:

$$I_{p,c} = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A c_O^* D_O^{1/2} v^{1/2} \quad (2.7)$$

de donde se puede observar que $I_{p,c}$ depende también de la concentración de O en el seno de la solución, pero tendrá un valor más bajo, que para un proceso reversible, dependiendo del valor de α .

La relación entre los valores de corriente anódica y catódica es 1,27 (para un α de 0.5) (Wang, 2003).

Sistemas difusionales. Procesos cuasi-reversibles.

Matsuda y Ayabe (1955) asignaron el término “*cuasi-reversible*” a reacciones que muestran limitaciones en la cinética de transferencia electrónica, donde la reacción inversa debe ser considerada. Aquí la corriente está controlada por la velocidad de transferencia electrónica y por la velocidad de transferencia de masa desde la solución a la interfaz electrodo-solución. Para estos procesos $10^{-1} > k^0 > 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$.

La forma del voltamperograma es función de $k^0 / \sqrt{\pi a D}$, donde $a = n F v / R T$. Cuando

$k^0 / \sqrt{\pi a D}$ es grande (k^0 es grande o v es pequeña) se puede inferir un proceso reversible.

En el caso contrario (k^0 pequeña o v grande) se puede considerar al proceso irreversible (Wang, 2003).

Sistemas con reacciones químicas acopladas

La aparición de reacciones químicas acopladas antes o después del proceso redox, afecta directamente la concentración disponible de las especies electroactivas. Es común que estas reacciones homogéneas acopladas ocurran en reacciones de óxido-reducción de especies orgánicas o inorgánicas. Se podría pensar en la existencia de este tipo de fenómenos por cambios en la forma del voltamperograma cíclico, como resultado de una competencia química por el reactivo o producto electroquímico. La forma de los voltamperogramas, puede ser extremadamente útil para la dilucidación de estas vías de reacción y para obtener información química viable acerca de los intermediarios.

En el caso de estar en presencia de un mecanismo EQ (Electroquímico Químico): $O + ne^- \rightleftharpoons R \rightarrow Z$, el voltamperograma cíclico exhibirá un pico de oxidación pequeño o

directamente no mostrará tal pico inverso. Es posible variar las velocidades de barrido (cambiar el tiempo del experimento) para permitir que R se re oxide y así poder observar el pico anódico complementario.

Existen numerosos mecanismos de reacción diferentes, gobernados cada uno por un sistema de ecuaciones que surgen de la resolución de las ecuaciones diferenciales obtenidas después de plantear las Leyes de la Difusión de Fick y las condiciones iniciales y de contorno para el sistema específico estudiado.

Sistemas Superficiales

Puede suceder que la especie electroactiva en lugar de difundir hacia la interfaz electrodo-solución, descargarse y volver a difundir hacia el seno de la solución, se adsorba sobre la superficie del electrodo antes o después de descargarse, es decir, el reactivo o el producto pueden estar involucrados en un proceso de adsorción, como así también en un proceso de desorción (Figura 2.4) (Bard y Faulkner, 2001). Se habla entonces de *pares redox superficiales o adsorbidos*. Cuando las dos especies del par redox están adsorbidas sobre la superficie del electrodo de trabajo, los voltamperogramas cíclicos difieren de aquellos de cuplas controladas por difusión y, en una primera instancia, resulta fácil reconocer este tipo de sistemas. Los picos *son más finos y más gaussianos* (Wang, 2003). Con los barridos sucesivos se puede apreciar un aumento en las corrientes de pico catódico y anódico, lo que estaría indicando una acumulación por adsorción progresiva.

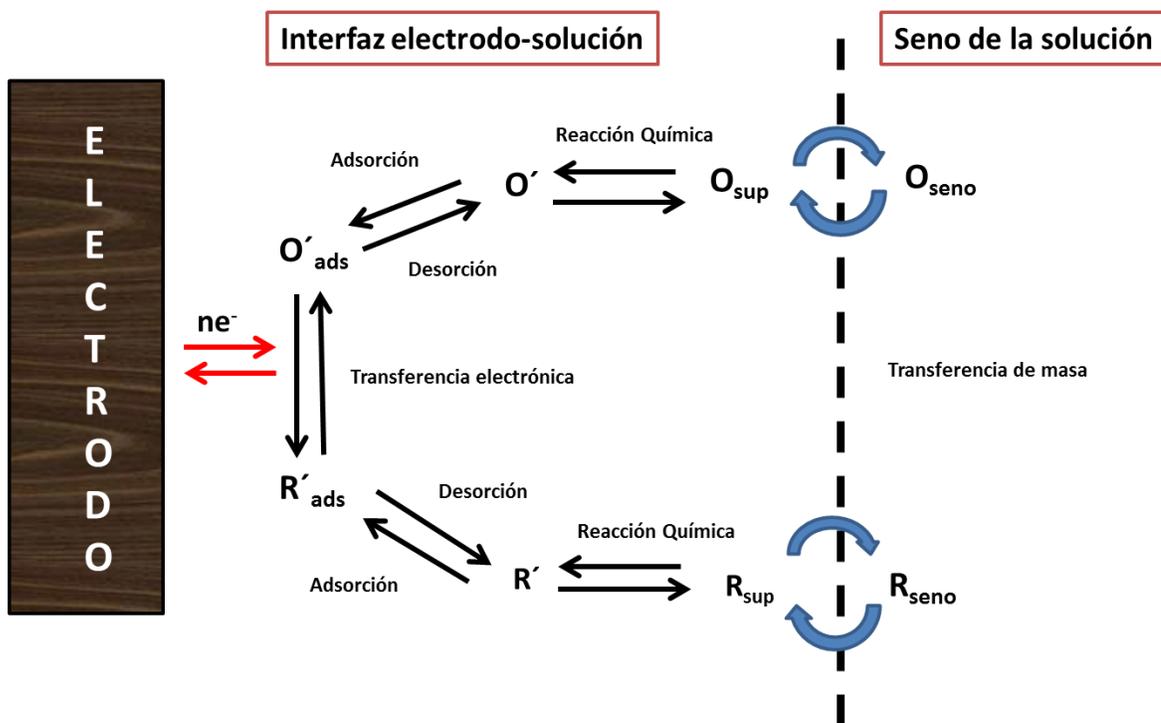


Figura 2.4. Esquema general de una reacción de electrodo.

Otro aspecto a destacar en la interpretación de los voltamperogramas cíclicos de sistemas adsorbidos (Figura 2.5) es que el ΔE_p es más pequeño comparado con dicha diferencia para un proceso controlado por difusión.

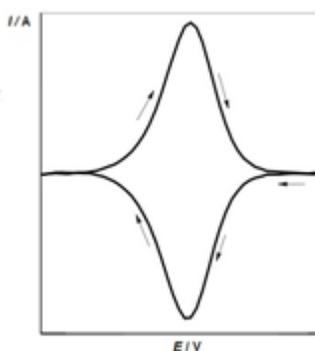


Figura 2.5. Voltamperograma cíclico ideal para un par redox superficial, donde ambos el reactivo y el producto de la reacción están adsorbidos sobre la superficie del electrodo.

Considerando un comportamiento tipo Nernst ideal, con $\Delta E_p = 0$ V, se tiene:

$$\Delta E_{p/2} = 0,0906/n \text{ V a } 25^\circ\text{C} \quad (2.8)$$

donde $\Delta E_{p/2}$ es el ancho de pico a la altura media.

Además, la $I_{p,c}$ es directamente proporcional al recubrimiento superficial (Γ) y a la velocidad de barrido:

$$I_{p,c} = \frac{n^2 F^2 \Gamma A v}{4 R T} \quad (2.9)$$

Por otro lado, el área debajo del pico de corriente, es decir la carga consumida durante el proceso redox (Q), puede permitir el cálculo del Γ , si se conoce el número de electrones intercambiados y el área del electrodo.

$$Q = n F A \Gamma \quad (2.10)$$

El proceso es más complejo cuando las especies en solución también participan del proceso de electrodo y/o cuando sólo una de las especies de la cupla redox está adsorbida. En estos casos, los picos de adsorción pueden ser vistos juntos con los picos normales controlados por difusión. Cuando sólo la especie O está adsorbida, el pico de adsorción sigue al pico controlado por difusión (un post-pico); cuando sólo la especie R está adsorbida, el pico de adsorción precede al pico controlado por difusión (un pre-pico) (Bard y Faulkner, 2001).

Sistemas mixtos

Puede ocurrir que un proceso de electrodo esté controlado por la difusión del analito hacia aquel y que, además, ocurra la adsorción de la molécula target (control mixto: difusión-adsorción). Debido a que la $I_{p,c}$ para un proceso superficial es proporcional a la velocidad de barrido y que para un proceso controlado por difusión, la $I_{p,c}$ es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, en esta situación se asume que la corriente de pico es la suma de las corrientes de pico del proceso superficial y del proceso controlado por difusión. En 1987, Conway y Kannangara explicaron este comportamiento mediante la siguiente ecuación:

$$I_{p,c} = k_1 v + k_2 v^{1/2} \quad (2.11)$$

donde las k_s son constantes de proporcionalidad que tienen las dimensiones apropiadas:

$$k_1 = (n^2 F^2 / 4 R T) \Gamma A \quad (2.11.1) \text{ y } k_2 = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} D_o^{1/2} c^* A \quad (2.11.2).$$

2.11 puede ser re-escrita como:

$$I_{p,c} v^{-1/2} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (2.12)$$

Así, un gráfico de $I_{p,c} v^{-1/2}$ vs. $v^{1/2}$ permite diferenciar la contribución a la corriente por parte la especie adsorbida y por la especie que llega a la superficie del electrodo por difusión y, determinar los parámetros característicos tales como el D_o y Γ .

2.1.5.2. Amperometría

En la técnica de **amperometría** el potencial aplicado (E_a) al ET se mantiene a un valor constante en el tiempo, con respecto al ER y se mide la corriente resultante de la oxidación o reducción de la especie en estudio (Bard y Faulkner, 2001). Por lo tanto, las

medidas analíticas se realizan midiendo directamente la corriente estacionaria, que es proporcional a la concentración de la especie electroactiva. Cuando la amperometría se realiza bajo condiciones de convección, en una solución agitada, la concentración de la especie electroactiva se mantiene constante en las proximidades del electrodo. La técnica consiste en aplicar el potencial elegido y, una vez que la línea de base se estabiliza (corriente de base), se adiciona una alícuota dada del analito en estudio y se espera un dado tiempo para que la corriente alcance un estado estacionario. La señal analítica cuantificable se obtiene como la diferencia entre las corrientes obtenidas en presencia de distintas concentraciones del analito y la corriente de base (ΔI_{EE}).

2.1.6. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

Las medidas electroquímicas para evaluar el comportamiento del electrodo y/o materiales del electrolito, generalmente, aplican un estímulo eléctrico (potencial o corriente) al electrodo y observan la respuesta (en potencial o en corriente). Se asume que las propiedades del sistema electrodo-material son invariantes con el tiempo, y este es uno de los supuestos básicos de la **espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)** (Barsoukov y Macdonald, 2005).

Una señal sinusoidal se aplica a la celda:

$$E(t) = E_o \text{sen}(wt) \quad (2.13)$$

La corriente de estado estacionario resultante se puede expresar de la siguiente manera:

$$I(t) = I_o \text{sen}(wt + \phi) \quad (2.14)$$

donde ϕ es la diferencia de fase entre el potencial y la corriente.

La relación entre las propiedades del sistema y la respuesta periódica del potencial o la excitación de corriente es muy compleja en el dominio del tiempo. En general, se requiere la solución de un sistema de ecuaciones diferenciales. Afortunadamente, el uso de la transformada de Fourier permite simplificar significativamente el tratamiento matemático del sistema.

La impedancia podría ser definida no sólo para sistemas discretos, sino también para sistemas arbitrarios, de tal manera que la transformada de Fourier de la ecuación diferencial se define como la respuesta en potencial dividida por la transformada de Fourier de la excitación de corriente periódica:

$$Z(j\omega) = F\{E(t)\}/F\{I(t)\} \quad (2.15)$$

donde el operador $F\{\}$ denota la transformada de Fourier. De todas maneras, la transformada de Fourier sólo reduce ecuaciones diferenciales a una ley de Ohm más simple, bajo condiciones de linealidad, causalidad y estacionalidad del sistema.

El concepto de impedancia electroquímica fue introducido por primera vez por Oliver Heaviside en el año 1882. La impedancia es un concepto más general que la resistencia porque toma en cuenta diferencias de fase.

La impedancia es una rama específica de las medidas electroquímicas. La magnitud y la dirección del vector planar en la mano derecha de un sistema ortogonal de ejes se puede expresar como la suma de un vector de componentes a y b a lo largo de los ejes, esto es, por el número complejo $Z = a + jb$. El número imaginario $j \equiv \sqrt{-1} \equiv \exp(j\pi/2)$ indica una rotación antihoraria de $\pi/2$ relativa al eje x . Luego, la parte real de Z , a , es en dirección del eje real x , y la parte imaginaria b es a lo largo del eje y .

La impedancia:

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' \quad (2.16)$$

es un vector de cantidad y puede ser graficada en el plano, ya sea en coordenadas rectangulares o polares (Figura 2.6). Aquí, los valores de las coordenadas rectangulares son claramente:

$$Re(Z) \equiv Z' = |Z| \cos \phi \quad (2.17)$$

$$Im(Z) \equiv Z'' = |Z| \sen \phi \quad (2.18)$$

donde
$$\phi = \tan^{-1}(Z''/Z') \quad (2.19)$$

y el módulo es
$$|Z| = [(Z')^2 + (Z'')^2]^{1/2} \quad (2.20)$$

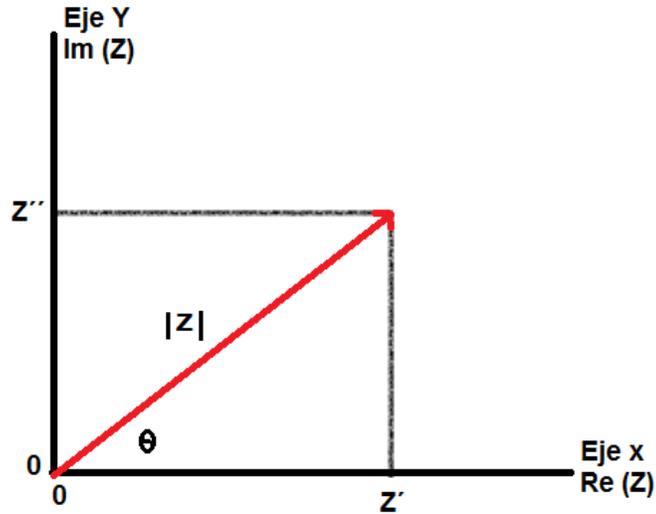


Figura 2.6. La impedancia Z graficada como un vector plano, utilizando coordenadas rectangulares y polares.

2.1.6.1. Circuito equivalente de una celda electroquímica

Una celda electroquímica puede ser considerada como una impedancia a una pequeña excitación sinusoidal, por lo que puede ser representada mediante un circuito equivalente de resistencias y capacitores en serie y/o en paralelo (Bard y Faulkner, 2001). El circuito más frecuentemente utilizado es el circuito de Randless (Figura 2.7).

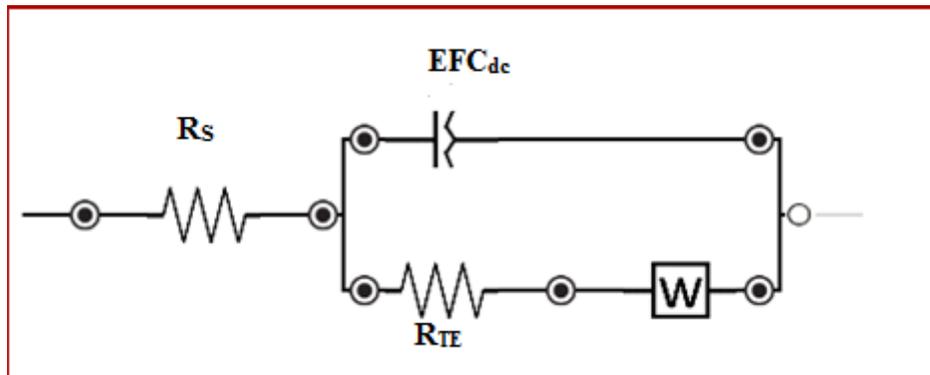


Figura 2.7. Circuito equivalente de Randless.

Este circuito incluye a:

- R_S que es la resistencia de la solución.
- una combinación en paralelo con C_{dc} que es el capacitor de la doble capa. En realidad, éste es un elemento de fase constante (EFC_{dc}), que simula el comportamiento no ideal del capacitor y combina la capacitancia debido a la modificación de la superficie y la capacitancia de la doble capa.
- R_{TE} que es la resistencia a la transferencia de carga.
- W conocido como elemento de Warburg, que contempla el transporte de masa difusional de los reactivos y productos del proceso redox.

2.1.7. Material del electrodo de trabajo

Todo experimento voltamperométrico está fuertemente influenciado por el **material** del ET. La elección del mismo depende del comportamiento redox de la molécula de interés y de la corriente del blanco (solvente/electrolito soporte) en la región de potencial requerida para la medida. También se pueden mencionar, como variables que influyen sobre tal decisión, la ventana de potencial de interés, la conductividad eléctrica, la reproducibilidad de la superficie, propiedades mecánicas, costo, viabilidad y toxicidad.

Los electrodos basados en **materiales de carbono** presentan un intervalo de potencial más grande que los electrodos sólidos metálicos. Los diferentes tipos de material de electrodo basados en carbono comparten la característica de poseer una estructura básica de un anillo aromático de seis miembros, con una hibridización sp^2 , mientras que difieren en la densidad relativa de los bordes y del plano basal en sus superficies. Los electrodos de carbono se clasifican en dos tipos: homogéneos (carbono vítreo, grafito, capa estampada o “screen printed”, fulerenos, nanotubos y diamante) y heterogéneos (pasta de carbono, pasta de carbono modificada, etc.).

Uno de los materiales más populares de carbono es el carbono vítreo, el cual ha sido reconocido por sus excelentes propiedades mecánicas y eléctricas, amplia ventana de potencial, inercia química y una performance relativamente reproducible. Su estructura involucra láminas de grafito en forma de cintas enredadas delgadas y reticuladas. Posee alta densidad y un pequeño tamaño de poro (Wang, 2003).

Mientras que la Electroquímica es una disciplina en sí misma desde hace siglos, la búsqueda de mejores materiales de electrodos que cubran las necesidades de la ciencia y de la sociedad es ilimitada. “Mejores” materiales aquí hace referencia a diferentes conceptos, como el más ligero, el que tenga mayor capacidad de almacenamiento de energía, la mayor selectividad, mayor sensibilidad, menos frágil, menos tóxico, entre otros (Pumera, 2010). En este contexto, los electrodos químicamente modificados representan una alternativa interesante y muy desarrollada a la hora de tratar con materiales de electrodo. Con frecuencia este tipo de electrodos se preparan mediante la modificación de un sustrato conductor para generar un electrodo con una función particular. Las propiedades de este nuevo electrodo modificado ya no son las mismas que las del electrodo sin modificar (Bard y Faulkner, 2001). En estos casos, el sustrato es la plataforma donde la capa modificadora se ensambla. La modificación puede ser llevada a cabo por adsorción irreversible, por la unión covalente de una mono-capa y/o por el revestimiento del electrodo con films de polímeros u otros materiales.

Desde el año 2004 a la actualidad, el **grafeno (G)** se ha convertido en uno de los materiales más utilizados en diferentes áreas de la ciencia, debido a sus enormes y variadas propiedades físicas, químicas y mecánicas (Geim y Novoselov, 2007). En el año 2010, Novoselov y Geim ganaron el Premio Nobel de Física por la producción, aislación, identificación y caracterización de G.

Cuando se habla de la familia del G, en ocasiones se tratan sin distinción los términos G, óxido de grafeno (OG), óxido de grafeno reducido (OGR) y óxido de grafeno parcialmente reducido (OGPR). Todas estas variantes se diferencian, básicamente, en el grado de oxidación del carbono. Es importante diferenciar los diferentes tipos de materiales en base a sus estructuras, para luego poder comprender sus potenciales propiedades en Electroquímica.

El término **GRAFENO** (Figura 2.8) hace referencia a una monocapa de átomos de carbono, con hibridización sp^2 , como una molécula aromática poli-cíclica, adoptando una estructura del tipo “panal de abeja” (Chen y col., 2012, Lei y col., 2014). En su estructura sólo están presentes átomos de carbono e hidrógeno (Kochmann y col., 2012). Es preciso tener en cuenta (para entender la transferencia electrónica heterogénea que, en las láminas, existen dos regiones: el plano basal y los bordes (Pumera, 2010). Se ha

demostrado que el G posee alta absorción óptica (Stauber y col., 2008), alta conductividad térmica (Balandin y col., 2008), es un material ligero (Mecklenburg y col., 2012), tiene movilidad electrónica alta bajo condiciones ambientales (Morozov y col., 2008) y fuerza mecánica alta (Lee y col., 2008).

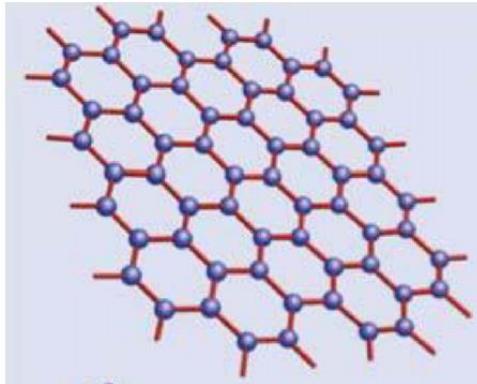


Figura 2.8. Estructura del grafeno.

El **OG** consiste de una mono-capa de óxido de grafito y se produce, usualmente, a través de la oxidación química de grafito con la consecuente dispersión y exfoliación en agua o en solventes orgánicos. En general, se propone para éste la presencia de grupos funcionales oxigenados en las láminas (Figura 2.9), que se diferencian en hidroxilos y epóxidos en el plano basal, con pequeñas cantidades de carbonilos, carboxilos, fenoles y lactonas en los bordes de las láminas (Chen y col., 2010).

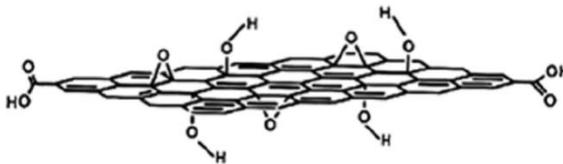


Figura 2.9. Estructura simplificada del óxido de grafeno.

Este material presenta propiedades electrónicas, mecánicas y electroquímicas fuertemente influenciadas debido a la presencia de los grupos funcionales oxigenados, que lo terminan diferenciando del G original. Los grupos funcionales oxigenados le restan conductividad eléctrica, lo que limita su aplicación en materiales de electrodos (Chen y col., 2010) y resulta así necesaria la reducción del OG para la mayoría de las aplicaciones electroquímicas (Luo y col., 2013), es decir, la remoción de los grupos oxigenados para recuperar parcialmente la excelente conductividad del G.

A partir del OG, es posible preparar **OGR**. Esto puede lograrse por medio de la reducción del primero a través de una vía química con hidracina (Zhou y col., 2009; Ren y col., 2012; Pattar y Nandibewoor, 2015), boro-hidruro de sodio (Kubesa y col., 2014), hidroquinona (Sher Shah y col., 2012), poli (cloruro de diallildimetilamonio) (Li y col., 2015). Del mismo modo se han utilizado agentes reductores naturales, como melatonina, vitamina C, azúcar, albúmina de suero bovino y algunas bacterias (Akhavan y col., 2012). También se ha informado sobre la reducción química de OG con resveratrol (Gurunathan y col., 2015).

Además, la reducción puede producirse por vía electroquímica, térmica, a través de luz, por métodos biológicos o bien por ultrasonido en agua y agitación en agua caliente (Loryuenyong y col., 2013).

En lo relacionado con la vía electroquímica, el primer informe de un método electroquímico amigable ambientalmente data del año 2009, donde Zhou y col. redujeron OG a través de voltamperometría de barrido lineal. Resultados obtenidos por Pumera (2010) mostraron que una reducción electroquímica del OG a través de una técnica potencioestática dejó una conductividad para el OGR 8 órdenes de magnitud mayor que el OG y la relación O/C para el OGR fue de 4,23% y para el OG del 69,2%. De esta manera, con la reducción se eliminan gran parte de los grupos oxigenados del OG. Según Jiang y col. (2012) la mayor parte de los grupos funcionales, como epóxido, alcohol, cetona, lactona y ésteres se eliminan del OG (Figura 2.10), a través de una voltamperometría de barrido lineal desde un potencial de -0,76 a -1,48 V vs ECS (electrodo de calomel saturado). Sólo aquellos grupos que no pueden ser reducidos electroquímicamente permanecen sobre las láminas.

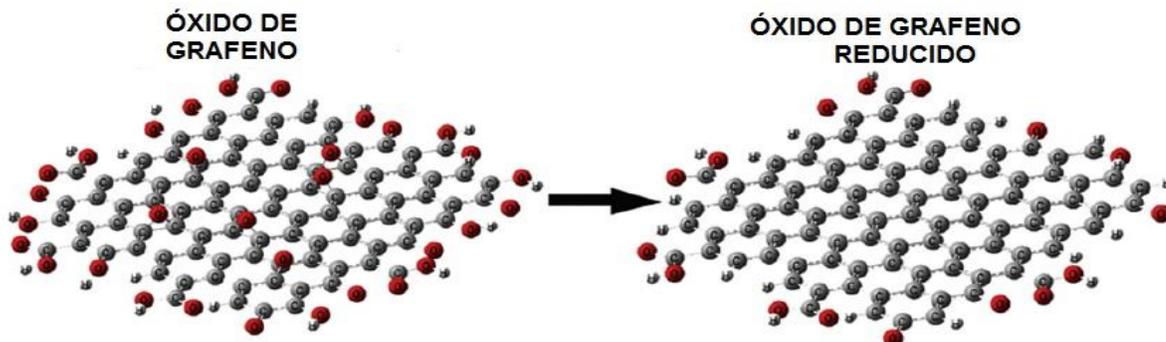


Figura 2.10. Reducción de OG a OGR (Jiang y col., 2012).

En la Figura 2.11 se muestra un esquema que resume la ruta de obtención de los distintos derivados del grafito.

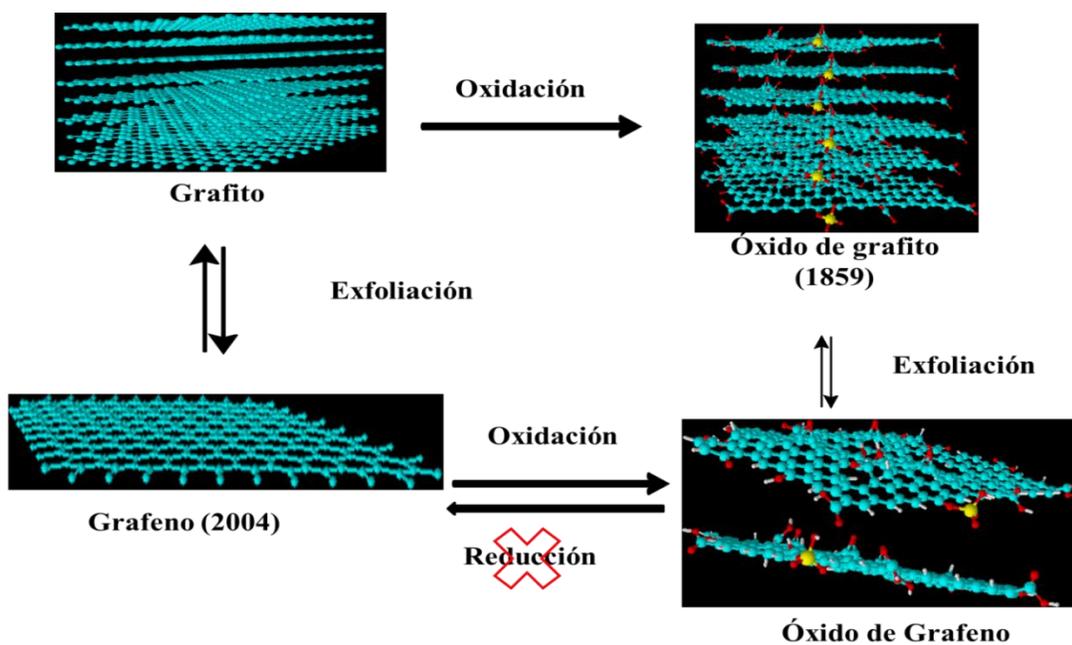


Figura 2.11. Esquema que representa la ruta de obtención de los distintos derivados del grafito.

En base a lo expuesto anteriormente y al esquema anterior, es posible afirmar que de la reducción del OG no se obtiene G, ya que, como se describió anteriormente siempre persisten sobre las láminas de OG una cierta cantidad de grupos oxigenados. Por este motivo, se cree conveniente utilizar el término OGPR, al referirnos al producto obtenido a partir de la reducción de OG.

Desde el punto de vista de la transferencia electrónica heterogénea, el OGR u OGPR presenta mayor conductividad que el OG. Es por ello que el OGR se prefiere cuando se trabaja con electrodos modificados para determinaciones de sustratos, ya que presenta mayor sensibilidad y actividad electro-catalítica (Lei y col., 2014). El OGR es el material más comúnmente usado (68% de todas las publicaciones) (Kochmann y col., 2012). Lo anterior puede deberse a su fácil obtención, síntesis en escala y bajo costo. El OGR se asemeja al grafeno en términos de sus propiedades eléctricas, térmicas y mecánicas (Bai y col., 2013; Bai y Shu, 2015).

2.1.8. Isotermas de adsorción

Se define como electrosorción a la adsorción que se produce sobre un electrodo cuando el mismo está en contacto con una solución electrolítica. Una de las mayores diferencias que existe entre la adsorción desde una fase gaseosa y desde una solución es que, en el primer caso, el sustrato se encuentra desnudo y en el segundo caso está solvatado (Gileadi, 1967).

La adsorción puede ser específica, es decir, que la interacción entre el adsorbato y la superficie del electrodo genera la formación parcial o total de una capa sobre la superficie del electrodo.

Cuando la sustancia que se adsorbe es electroactiva, el tratamiento teórico de un método electroquímico tiene que ser modificado con el fin de contabilizar la cantidad de especie electroactiva que se encuentra adsorbida sobre la superficie del electrodo, la cual será más grande que la concentración inicial en el seno de la solución. En este caso, los procesos faradaicos pueden ser utilizados para determinar la cantidad de especie electroactiva, la cual, en muchos casos, depende del tamaño del adsorbato y de su orientación sobre el electrodo. Para moléculas de bajo peso molecular, los recubrimientos

superficiales se encuentran alrededor de 10^{-9} a 10^{-10} mol cm^{-2} . Esta cantidad se asocia con una monocapa de adsorbato sobre la superficie (Bard y Faulkner, 2001).

Se denomina **isoterma de adsorción** a la relación que existe entre la concentración superficial y el potencial químico o electroquímico, generalmente, expresado como una función de la concentración (c) en el seno de la solución o el potencial (V) a través de la superficie:

$$\theta = K f(c) \text{ ó } \theta = K f(V) \quad (2.21)$$

donde θ representa la fracción de recubrimiento superficial, es una relación entre la cantidad de especie i que hay en el seno de la solución y la que hay en la superficie.

Así, una isoterma de adsorción muestra cómo se relaciona la cantidad de sustancia i adsorbida sobre el electrodo por unidad de área (Γ_i), la actividad en el seno de la solución a_i^b y el estado eléctrico del sistema, E o q^M a una dada temperatura. La concentración superficial puede obtenerse a partir de la concentración en el seno de la solución y según la relación que se asuma entre Γ_i y a_i^b se tendrán distintos modelos de isotermas.

Isoterma de Langmuir

Este modelo asume que no existen interacciones entre las moléculas adsorbidas sobre la superficie del electrodo, que no hay heterogeneidad sobre la superficie del electrodo y, además, asume altas actividades en el seno de la solución. Teniendo en cuenta que la velocidad de adsorción es proporcional a la fracción de la superficie no ocupada ($1-\theta$) y a la actividad (o concentración, c) en el seno de la solución, y la velocidad de desorción es proporcional a θ , en el equilibrio se tiene que:

$$k_1(1 - \theta) c = k_{-1} \theta \quad (2.22)$$

Entonces ésta isoterma presenta la siguiente forma:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \beta c \quad (2.23)$$

donde: $\beta = \frac{k_1}{k_{-1}} = \exp(-\Delta G_{ads}^0 / RT)$ y ΔG_{ads}^0 es la energía libre de adsorción.

Las interacciones laterales que podrían existir entre las moléculas de adsorbato en la superficie del electrodo derivaron en que la energía de adsorción podría ser una función del recubrimiento superficial.

Isoterma de Temkin

Tiene en cuenta las interacciones mencionadas previamente, su expresión es la siguiente:

$$\theta = \frac{RT}{2g} \ln(\beta c) \quad (2.24)$$

Aquí $0,2 < \theta < 0,8$.

Isoterma de Frumkin

Presenta la siguiente expresión:

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp(-g'\theta) \quad (2.25)$$

donde $0,2 < \theta < 0,8$.

En este modelo se asume que la energía libre de adsorción electroquímica se relaciona linealmente con Γ_i :

$$\Delta G_{ads}^0(\text{Frumkin}) = \Delta G_{ads}^0(\text{Langmuir}) - 2 g' \Gamma_i \quad (2.26)$$

El parámetro g' tiene unidades de $J \text{ mol}^{-1}$ o de mol cm^{-2} y representa la manera en que un incremento en el porcentaje de recubrimiento cambia la energía de adsorción de las especies. Si es positivo, las interacciones entre las especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo son atractivas; si es negativo, tales interacciones son repulsivas. Si

$g' \rightarrow 0$ (lo cual indicaría que no habría interacciones entre las especies), la isoterma de Frumkin tiende a la de Langmuir. En general, $-2 \leq g' \leq 2$.

Isoterma de Freundlich

Su formulación no se basa en modelos teóricos si no en bases empíricas. Su expresión es la siguiente:

$$\Theta = \beta c^n \quad (2.27)$$

Aquí $0 < n < 1$ y β es una constante para un proceso superficial a una dada temperatura y es una medida de la capacidad y el promedio de afinidad, mientras que n es el índice de heterogeneidad (tiene valores de 0 a 1, donde 1 representa un proceso homogéneo) (Appell y col., 2007).

Esta isoterma asume una distribución de energías de adsorción como consecuencia de una superficie del sólido no uniforme (Marchiando y col., 2003).

2.2. Biosensores electroquímicos

Según la IUPAC, un sensor químico es “*un dispositivo que transforma información química, que va desde un componente específico de la muestra a un análisis de composición total, en una señal analítica útil. Esa información química puede ser originada por una reacción química del analito o bien, por una propiedad física del sistema a estudiar*”.

Por otra parte, la IUPAC también define a un **biosensor** como un sensor químico donde el sistema de reconocimiento utiliza un componente biológico. En base al tipo de elemento de reconocimiento biológico que posea, se puede tratar de un sensor biocatalítico o de bioafinidad. Para el primer tipo, los biocatalizadores son enzimas, por lo tanto, se tiene un **biosensor enzimático**, el que se define como un dispositivo analítico que posee una *enzima* como bioreceptor integrado o íntimamente asociado con el transductor físico para producir una señal óptica/eléctrica, que es proporcional a la concentración del analito presente en la muestra (Karunakaran y col., 2015).

Los biosensores que combinan reacciones enzimáticas con detección electroquímica, presentan importantes ventajas sobre otros métodos de determinación de fenoles (entre otros sustratos), incluyendo un menor tiempo de medida, especificidad y menor demanda instrumental (Kong y col., 2001).

2.2.1. Enzimas y cinética enzimática

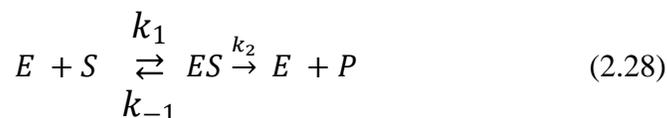
Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores efectivos en procesos biológicos (Morrison y Boyd, 1998). Una de las características más sobresalientes de las enzimas es su poder catalítico. El sitio activo de la enzima es una región de la parte proteica de la enzima adonde se une el sustrato y el grupo prostético es la parte no proteica que poseen algunas enzimas y que une de manera covalente a la parte proteica. Es indispensable para realizar la función catalítica de esas enzimas

Vinculando el concepto de enzima como catalizador con el de cinética química, es posible considerar que la particularidad esencial de un catalizador es que influye en la velocidad de una reacción química pero que no se consume durante el proceso, desde luego esto no supone que el catalizador permanezca inalterado en cuanto a su estructura

durante la reacción. Por el contrario, es bien conocido que, en todas las clases de catálisis, la molécula de catalizador sufre una reacción química con las especies reaccionantes. Ciertas evidencias hacen suponer que se forma una especie intermedia entre el catalizador y el “sustrato”, la sustancia que está experimentando la reacción (Laidler y col., 1972).

Cada enzima cataliza un tipo específico de reacción química. Se reconocen seis tipos principales, según la IUBMB (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular) (Blanco, 2006).

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas fue estudiada inicialmente en la última parte del siglo XIX. El biólogo Brown (1892) introdujo la idea de un complejo enzima-sustrato en un contexto puramente cinético (Cornish-Boeden, 1995). Más adelante, ya en el siglo XX, Michaelis y Menten (1913) estudiando la catálisis de la invertasa en la transformación química de sacarosa en glucosa y fructosa, corroboraron la hipótesis de Brown. Ambos científicos desarrollaron medidas de velocidad inicial en función de la concentración variable de sacarosa y ajustaron sus datos asumiendo que la unión de la enzima con su sustrato está gobernada por un equilibrio químico y, que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato. Demostrando que la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sacarosa seguía una relación del tipo hiperbólica, ellos dieron la evidencia para afirmar la hipótesis de que la catálisis de la enzima se debía a la formación de un complejo enzima-sustrato y encontraron, por primera vez, una “imagen” de la afinidad de la enzima por su sustrato (Johnson y Goody, 2011). Para concentraciones bajas de sustrato, la velocidad varía linealmente con la concentración (la cinética es de primer orden con respecto al sustrato), mientras que para concentraciones elevadas del sustrato, la velocidad se independiza de ésta. Eso fue explicado por Michaelis y Menten a partir del siguiente mecanismo (Blanco, 2006):



donde E es la enzima, S es el sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato, P es el producto de la reacción enzimática, k_1 y k_{-1} las constantes específicas de velocidad de la

reacciones directa e inversa, respectivamente, de la primera etapa y k_2 la correspondiente constante de velocidad para la descomposición del complejo ES.

La expresión que caracteriza este comportamiento es la siguiente:

$$v = \frac{V_{max} c_s^*}{K_M^{AP} + c_s^*} \quad (2.29)$$

donde c_s^* es la concentración de sustrato (M), V_{max} es la velocidad máxima para la formación del producto de la reacción catalizada por la enzima ($M s^{-1}$) y K_M^{AP} , conocida como constante aparente de Michaelis-Menten, representa la c_s^* a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} . En la Figura 2.12 se muestran los conceptos descriptos hasta aquí.

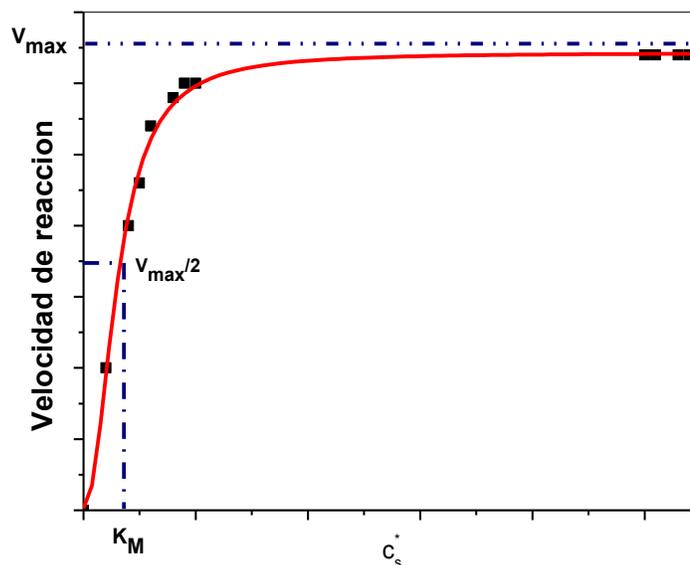


Figura 2.12. Comportamiento típico obtenido para la velocidad de la reacción enzimática con respecto a la c_s^* .

Es posible linearizar la ecuación 2.29 y obtener la conocida ecuación de Lineweaver-Burk o de la doble inversa (Figura 2.13):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M^{AP}}{V_{max}} \frac{1}{c_s^*} \quad (2.30)$$

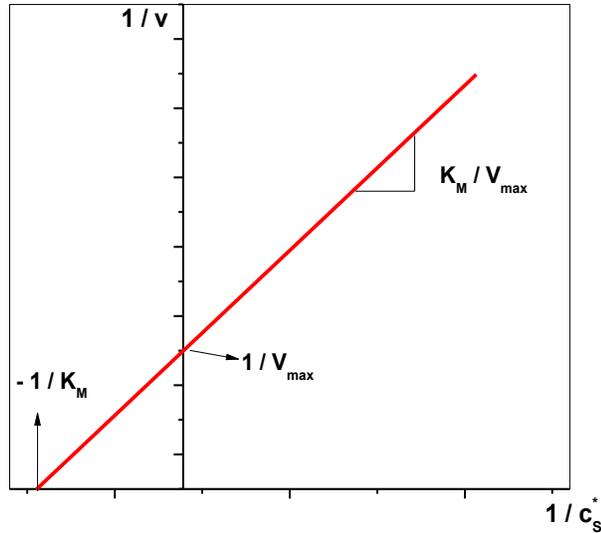


Figura 2.13. Representación de la ecuación de Lineweaver-Burk.

2.2.2. Peroxidasas y cinética de las peroxidasas

De los seis grupos de enzimas que se pueden distinguir, uno de ellos es el que se encuentra constituido por las óxido-reductasas, dentro de las que es posible mencionar a las **peroxidasas**, las cuales son glicoproteínas que contienen un grupo hemo, como grupo prostético (Everse y col., 1990). La principal reacción catalizada por estas enzimas es la oxidación de dos tipos de sustratos, utilizando peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones: i) los sustratos que son oxidados mediante la transferencia de dos electrones y un protón y ii) los sustratos que se oxidan mediante la transferencia de un único electrón (Kulys y col., 1991).

Las peroxidasas de la clase III (según la clasificación de Welinder en 1992), son aquellas secretorias de plantas. Dentro de este grupo es posible citar a la enzima peroxidasa de soja (EPS), de particular interés, y otras conocidas peroxidasas como la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase o HRP), de cebada (BP1) y de maní (PNP) (Kamal y Behere, 2002). HRP es un clásico de las enzimas, mientras que EPS surgió en los años '90 (Ryan y col., 2006).

La EPS se encuentra en gran cantidad en la cáscara de la semilla de soja, lo que convierte a esta planta en una fuente buena, barata, estable y de alto rendimiento de peroxidadas. EPS presenta una alta termo-estabilidad y propiedades catalíticas únicas (Wang y col., 2001; Nisum y col., 2001). La enzima, como ya se mencionó antes, es una glicoproteína formada por 326 aminoácidos, de peso molecular de alrededor de 37 kDa (Kamal y Behere, 2002). En la Figura 2.14 se muestra la estructura de EPS publicada por Kamal y Behere (2003).

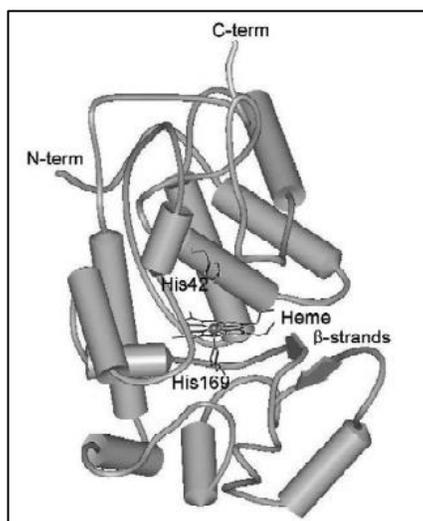


Figura 2.14. Estructura esquemática de EPS, obtenida de estudios cristalográficos, Kamal y Behere, 2003.

El comportamiento de las enzimas que catalizan reacciones que involucran dos reactivos diferentes fue dilucidado en 1953. Así, se delinearon las diferencias en el comportamiento cinético en reacciones de dos sustratos y dos productos de reacción de la siguiente manera: uno de los sustratos (A) se une a la enzima (E), a lo que sigue la liberación del primer producto (P). Se obtiene una enzima modificada (E'), sobre la cual se une el segundo sustrato (B), seguido de la formación del segundo producto (Q). Este mecanismo fue llamado como el “mecanismo ping-pong” (Figura 2.15).

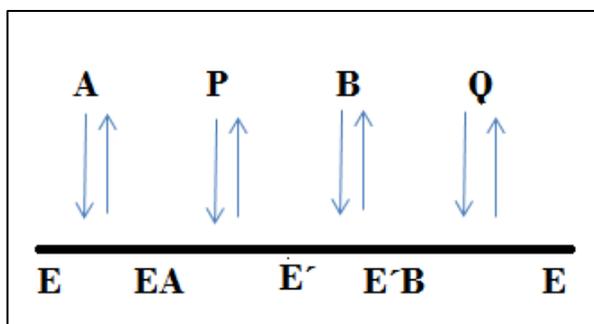


Figura 2.15. Esquema del mecanismo ping-pong.

El “mecanismo ping-pong” convencional es reversible, lo que conduce a un límite superior finito en lo que respecta a la velocidad. El mecanismo de las peroxidasas es similar al de “ping-pong”, con la diferencia de que las reacciones son usualmente irreversibles, lo que conduce a que no exista un límite superior finito para la velocidad. Cuando se añade alguno de los dos sustratos, la velocidad de la reacción continúa creciendo (Dunford, 1999).

Si bien existen en la literatura varios mecanismos propuestos acerca de la reacción de las peroxidasas, el más aceptado, conocido como ciclo peroxidativo, es el siguiente:



Donde *CoI* y *CoII* son dos especies intermediarias, *RH* y R^\bullet son el co-sustrato dador de electrones en su forma oxidada y reducida, respectivamente k_1 , k_2 y k_3 son las constantes de velocidad de cada una de las etapas de reacción. Este ciclo catalítico involucra tres etapas:

1) la oxidación de la enzima férrica nativa (Fe^{3+}) por el peróxido de hidrógeno para formar un grupo oxiferrilo ($Fe^{IV} = O$) y un catión radical π de la porfirina (*CoI*) (ecuación 2.31).

2) la reducción del catión radical de CoI por un dador monoeléctrico para dar el compuesto intermediario CoII (ecuación 2.32).

3) la reducción del grupo oxiferrilo por una segunda molécula del dador monoeléctrico para reconvertir la enzima a su estado nativo férrico (ecuación 2.33). (Andreu y col., 2007).

El ciclo de reacción de las peroxidasas es un mecanismo de reacción irreversible, como se muestra en la Figura 2.16.

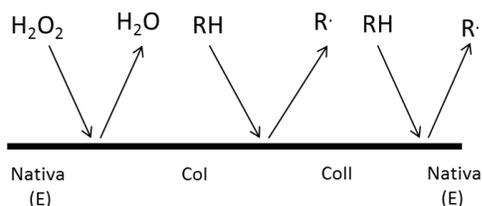


Figura 2.16. Esquema del “mecanismo ping-pong” de las peroxidasas.

El concepto de irreversibilidad en una reacción enzimática es que, para que ocurra una reacción, la enzima y el sustrato deben colisionar y formar algún tipo de complejo de encuentro. Para una reacción irreversible, la velocidad con que reacciona el complejo se compara con la velocidad con que este se disocia y, por lo tanto, se revierte a los reactivos iniciales, tal cual es el caso de la mayoría de las reacciones de las peroxidasas. Como consecuencia de esto, la velocidad de la reacción aparenta no tener un límite superior. A mayor concentración de reactivos, mayor velocidad para la reacción enzimática. Así, un gráfico de pseudo-primer orden de velocidad de formación del CoI vs concentración de peróxido de hidrógeno ($C_{H_2O_2}^*$) es lineal y no presenta saturación. La irreversibilidad observada no significa que la reacción inversa que vuelve a los reactivos iniciales tenga velocidad cero, sino que la velocidad no se puede medir. A medida que se incrementa la concentración, puede ocurrir alguna saturación eventual, o algún otro proceso, como la inactivación de la enzima (Dunford, 1999).

Considerando las ecuaciones 2.31-2.33, es posible calcular las constantes k_1 y k_3 (asumiendo que $k_2 \gg k_3$). La ecuación de estado estacionario puede ser escrita así:

$$v = \frac{2 c_{\text{ENZ}}^* k_3 c_{\text{RH}}^* c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*}{(k_3/k_1) c_{\text{RH}}^* + c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*} \quad (2.34)$$

La dependencia de v con $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*$ puede ser escrita como:

$$v = \frac{A c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*}{B c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*} \quad (2.35)$$

donde $A = 2 c_{\text{ENZ}}^* k_3 c_{\text{RH}}^* = K_M$ y $B = (k_3/k_1) c_{\text{RH}}^* = V_{\text{max}}$. Linearizando la ecuación 2.35 se obtiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{B}{A} \frac{1}{c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*} + \frac{1}{A} \quad (2.36)$$

de tal manera que un gráfico de v^{-1} vs $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*^{-1}$ permite calcular A y B para una c_{RH}^* constante. Un gráfico de A vs B es lineal y de su pendiente es posible calcular el valor de k_1 .

De la misma manera, la dependencia de v con la concentración del sustrato reductor (c_{RH}^*), puede ser escrita como:

$$v = \frac{A' c_{\text{RH}}^*}{B' c_{\text{RH}}^*} \quad (2.37)$$

donde $A' = 2 c_{\text{ENZ}}^* k_1 c_{\text{H}_2\text{O}_2}^* = K'_M$ y $B' = (k_1/k_3) c_{\text{H}_2\text{O}_2}^* = V'_{\text{max}}$. Linearizando la ecuación 2.37 se obtiene:

$$\frac{1}{v} = \frac{B'}{A'} \frac{1}{c_{\text{RH}}^*} + \frac{1}{A'} \quad (2.38)$$

de tal manera que un gráfico de v^{-1} vs $c_{\text{RH}}^*^{-1}$ permite calcular A' y B' para una dada $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*$ constante. Un gráfico de A' vs B' es lineal y de su pendiente es posible calcular el valor de k_3 .

No obstante, no es conveniente analizar las peroxidasas en términos de K_M^{AP} . Existen dos constantes de velocidad de segundo orden desconocidas, k_1 y k_3 , para la formación del CoI y la reducción del CoII, respectivamente. Por lo tanto, las peroxidasas poseen una ecuación de estado estacionario simple que existe para un mecanismo

reversible de dos sustratos. El equilibrio entre los reactivos y productos de las peroxidasas no se establece debido a la irreversibilidad de las reacciones (Dunford, 1999).

2.2.3. Estructura de los biosensores

Todo biosensor está compuesto de diferentes elementos, por lo tanto, existirán diversas maneras de diseñarlos. Se pueden emplear una gran variedad de elementos de reconocimiento biológico, desde enzimas hasta anticuerpos. También tiene una gran incidencia la elección del proceso de transducción y el material de transducción (Borgmann y col., 2010). En la Figura 2.17 se muestran los componentes de un biosensor y las distintas opciones que puede haber dentro de cada categoría.



Figura 2.17. Componentes de un biosensor. Esquema adaptado de Borgmann y col. (2010).

La elección del elemento de reconocimiento biológico constituye una decisión crucial cuando se comienza con el diseño de un nuevo biosensor. En el caso de que se trate de una enzima, la misma necesita reaccionar selectivamente con el analito de interés, ser estable bajo las condiciones de trabajo y de almacenamiento del biosensor y, además, debe proveer de un tiempo razonable de estabilidad.

Se denomina **inmovilización** de la enzima al proceso de unión del componente biológico al transductor, manteniendo la actividad enzimática. Los biosensores, usualmente, se diseñan con alta sobrecarga enzimática, para asegurar suficiente actividad biocatalítica y, de esta manera, las enzimas son provistas de un ambiente apropiado para mantener sus actividades. En general, hay 4 métodos principales para inmovilizar enzimas (Zhao y col. 2010):

- adsorción: física y/o química. La primera es más débil y ocurre vía fuerzas de Van der Waals. La segunda es más fuerte e involucra la formación de enlaces covalentes. Muchas sustancias adsorben enzimas en su superficie (alúmina, celulosa, silica gel, colágeno, grafeno reducido químicamente, etc.).
- atrapamiento: se refiere a la mezcla de un biomaterial con un monómero en solución, que luego es polimerizado a gel, quedando atrapado en el biomaterial. Este método puede retardar la difusión del sustrato. Además, puede ocurrir la pérdida de la actividad biocatalítica, a través de los poros del gel. Los geles pueden ser de poliacrilamida, nylon, polímeros conductores, etc.
- enlace covalente: el enlace ocurre entre un grupo funcional en el biomaterial y la matriz de soporte. Algunos grupos funcionales, que no son esenciales para la actividad catalítica de la enzima, pueden unirse covalentemente a la matriz de soporte. Para que la reacción ocurra se requieren condiciones especiales, como baja temperatura, baja fuerza iónica y pH fisiológico.
- entrecruzamiento: para este método, usualmente, el biomaterial es unido químicamente a un soporte sólido o a algún otro material de soporte, como un agente de entrecruzamiento. Este último puede interferir en la actividad enzimática a altas concentraciones.

En la sección 2.2.4, se mostrará otra alternativa para inmovilizar enzimas sobre la superficie de un electrodo, tal como aquella provista por la Química Supramolecular, en particular las interacciones “host-guest” (anfitrión-huésped).

Dependiendo del nivel de integración, los biosensores se pueden dividir en tres generaciones, las cuales se basan en el método de unión del elemento biológico a la base del elemento transductor. Así, están los biosensores de primera, segunda y tercera generación, cuyas características se describen en el esquema de la Figura 2.18.



Figura 2.18. Esquema que describe las características de los biosensores de primera generación ($1^{RA} G$), de segunda generación ($2^{DA} G$) y de tercera generación ($3^{RA} G$),

En particular, en los biosensores electroquímicos de primera generación ocurre la detección electroquímica directa del sustrato y/o producto de la reacción enzimática.

2.2.4. Construcción de un biosensor

Materiales derivados del grafeno

En lo que concierne al diseño y armado de un biosensor enzimático electroquímico, la mayor parte del G empleado es en realidad OGPR (Lv y col., 2013). Generalmente, el OG puede formar una dispersión estable en agua, debido al alto contenido de grupos oxigenados. De todos modos, si los grupos funcionales son

removidos a través de una reducción química, se obtiene el óxido de grafeno reducido químicamente (OGRQ) (sección 2.1.7). Así, las láminas pueden perder inmediatamente su dispersibilidad en agua y, luego, se pueden agregar y precipitar debido a las altas interacciones intercapas (Guo y col. 2010). Una alternativa ante esta dificultad es la modificación de las láminas, lo que puede lograrse mediante la introducción de nuevas moléculas funcionales entre capas.

Las betaciclodextrinas (β CD) (Figura 2.19A) pueden unirse a las láminas de OGRQ a través de enlaces puente hidrógeno fuertes. Así, el OGRQ resultante es más hidrofílico. En general, las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos compuestos por seis, siete u ocho moléculas de glucosa (α , β y γ CD, respectivamente). Tienen forma toroidal, con un exterior hidrofílico y una cavidad interna hidrofóbica (Guo y col., 2010; Lu y col., 2012).

El mecanismo de adsorción específica de β CD sobre las láminas de OG se considera de la siguiente forma: el OG posee grupos $-OH$, las β CD se adicionan a la dispersión de OG. En principio, las β CD se adsorben sobre la superficie del OG, como consecuencia de los fuertes enlaces puente hidrógeno que se forman entre ambos. Luego, se agrega el agente reductor (hidracina) y así, se obtiene un OGRQ con grupos funcionales $-OH$ remanentes, los cuales pueden continuar uniéndose fuertemente a las β CD (Guo y col., 2010).

Así, el OGRQ funcionalizado con β CD (Figura 2.19B) posee, simultáneamente, las propiedades singulares del OGRQ (gran área superficial y alta conductividad) y de las β CD (gran reconocimiento supramolecular y capacidad de enriquecimiento), para ser utilizado como un sensor electroquímico (Lu y col, 2012).

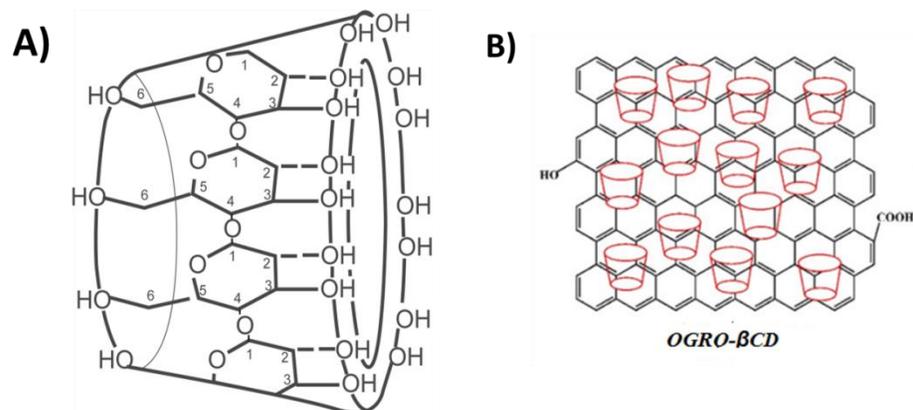


Figura 2.19. Representación de A) β CD y B) *OGRO*- β CD.

Inmovilización de la enzima

Otro uso para las β CD, en relación con la construcción de un biosensor enzimático, es que las mismas y sus derivados pueden formar un gran número de complejos con numerosos compuestos, a través de varios tipos de interacciones (fuerzas de Van Der Waals, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, dipolo-dipolo y unión puente hidrógeno) (Lu y col., 2012).

En el marco de las características de la Química Supramolecular, las CD también han sido utilizadas para inmovilizar enzimas modificadas con adamantano o 1-ácido carboxílico adamantano (ADA) (Figura 2.20A y Figura 2.20B, respectivamente), a través de interacciones “anfitrión-huésped”. De esta forma, las moléculas que, como las β CD, poseen un reconocimiento eficiente y selectivo hacia determinadas moléculas más pequeñas se llaman moléculas anfitrión (“host”), las cuales pueden ser compuesto cíclicos, llamados macrociclos, que tienen cavidades de tamaños específicos en su interior. Las moléculas más pequeñas, como el ADA modificado con EPS, se definen como huéspedes (“guest”), formando así un complejo anfitrión-huésped.

En lo que respecta a ADA modificado con enzimas, Fragoso y col. (2002) trabajaron con citocromo C (Cyt C), una proteína redox hemo. Villalonga y col. (2007) utilizaron estos principios para modificar una xantina oxidasa (XO). En 2013, Lu y col. demostraron que la HRP también puede ser utilizada para estos fines en el armado de un biosensor enzimático.

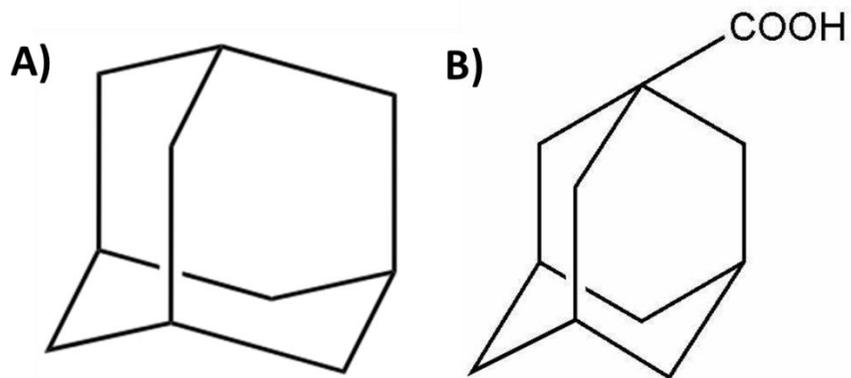


Figura 2.20. Representaciones de A) adamantano y B) 1-ácido carboxílico adamantano.

Utilización de nanopartículas metálicas

Por otra parte, es posible trabajar también con otros nanomateriales para mejorar ciertas características del biosensor. Así, las nanopartículas de oro (NPsAu) han encontrado numerosas aplicaciones en el desarrollo de biosensores, debido a sus excelentes características, tales como alta actividad catalítica, gran área superficial, pequeño tamaño, transporte de masa efectivo y, además, son amigables con el medio ambiente. Los electrodos modificados con NPsAu pueden reducir los sobre-potenciales y mejorar la electrocatálisis. Además, la combinación de NPsAu con algún material derivado del G, resulta de gran interés en el campo de los biosensores, ya que pueden producirse efectos sinérgicos, lo que llevaría a mejorar las características deseables del biosensor, como es la sensibilidad del mismo (Wang y col., 2013; Benvidi y col., 2015; Wu y col., 2016).

Referencias bibliográficas

Akhavan, O., M. Kalaei, Z. S. Alavi, S. M. A. Ghiasi, A. Esfandiar, “Increasing the antioxidant activity of green tea polyphenols in the presence of iron for the reduction of graphene oxide”, *Carbon* **50** (2012) 3015–3025.

Andreu, R., E. E. Ferapontova, L. Gorton, J. J. Calvente, “Direct electron transfer kinetics in horseradish peroxidase electrocatalysis”, *J. Phys. Chem. B* **111** (2007) 469-477.

Appell, M., D. F. Kendra, E. K. Kim, C. M. Maragos. “Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers as sorbents of monilifomin”, *Food Addit. Contam.* **24** (2007) 43-53.

Bai X., K.-K. Shiu, “Spontaneous Deposition of Prussian Blue on Reduced Graphene Oxide - Gold Nanoparticles Composites for the Fabrication of Electrochemical Biosensors”, *Electroanalysis* **27** (2015) 74–83.

Bai, X., G. Chen, K.-K. Shiu, “Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide modified electrode with Prussian blue and poly (toluidine blue O) coating”, *Electrochim. Acta* **89** (2013) 454–460.

Balandin, A. A., S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C. N. Lau, “Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene”, *Nano Lett.* **8** (2008) 902–907.

Bard, A. J., L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, J. Wiley & Sons, New York, USA, 2001.

Barsoukov E., Macdonald J.R., *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, 2nd Ed., J. Wiley, New Jersey, USA, 2005.

Benvidi, A., A. Dehghani-Firouzabadi, M. Mazloun-Ardakani, B. Mirjalili, R. Zare, “Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid and folic acid”, *J. Electroanal. Chem.* **736** (2015) 22-29.

Blanco, A., *Química Biológica*, El Ateneo, Argentina, 2006

- Borgmann S., A. Schulte, S. Neugebauer, W. Schuhmann, 20011. "Amperometric Biosensors". En Alkire Richard, Dieter Kolb y Lipkowski Jacek, *Advanced in Electrochemical Science and Engineering* (pp 1-84). WILEY-VCH. Weinheim. Alemania.
- Chen, D., H. Feng, J. Li, "Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications", *Chem. Rev.* **112** (2012) 6027–6053.
- Chen, D., L. Tang, J. Li, "Graphene-based materials in electrochemistry", *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3157-3180.
- Conway, B. E., D. C. W. Kannangara, "Zinc oxidation and redeposition processes in aqueous alkali and carbonate solutions", *J. Electrochem. Soc.* **134** (1987) 906-918.
- Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press Ltd, Londrés, Inglaterra 1995.
- Dunford, H. B., *Heme Peroxidases*, Wiley, New York, USA, 1999.
- Everse, J., M.B. Grisham, K.E. Everse, *Peroxidases in chemistry, Vol I y Vol II*, Press, 1990.
- Fragoso, A., J. Caballero, E. Almirall, R. Villalonga, R. Cao, "Immobilization of adamantane-modified cytochrome c at electrode surfaces through supramolecular interactions", *Langmuir* **18** (2002) 5051-5054.
- Geim, A. K., K. S. Novoselov, "The rise of graphene", *Nature Materials* **6** (2007) 183-191.
- Gileadi, E. (Ed.), *Electrosorption*, Plenum Press, New York, USA, 1967.
- Guo, Y., S. Guo, J. Ren, Y. Zhai, S. Dong, E. Wang, "Cyclodextrin functionalized graphene nanosheets with high supramolecular recognition capability: synthesis and host-guest inclusion for enhanced electrochemical performance", *ACS Nano* **4** (2010) 4001-4010.

Gurunathan, S., J. W. Han, E. Kim, J. H. Park, J.-H. Kim, “Reduction of graphene oxide by resveratrol: a novel and simple biological method for the synthesis of an effective anticancer nanotherapeutic molecule”, *Int. J. Nanomedicine* **10** (2015) 2951-2969.

Jiang, F., Z. Yao, R. Yue, Y. Du, J. Xu, P. Yang, C. Wang, “Electrochemical fabrication of long-term stable Pt-loaded PEDOT/graphene composites for ethanol electrooxidation”, *Int. J. Hydrog. Energy* **37** (2012) 14085–14093.

Johnson, K.A., R.S. Goody, “The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper”, *Biochem.* **50** (2011) 8264-8269

Kamal, J., D. V. Behere, “Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase”, *J. Inorg. Biochem.* **94** (2003) 236-242.

Kamal, J., D. V. Behere, “Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase”, *Biochem.* **41** (2002) 9034-9042.

Karunakaran, C., T. Madasamy, N. K. Sathy, *Enzymatic Biosensors*, Chapter 3. *Biosens. Bioelectron.*, Elsevier 2015.

Kochmann, S., T. Hirsch, O. S. Wolfbeis, “Graphenes in chemical sensors and biosensors”, *TrAC Trends Anal. Chem.* **39** (2012) 87–113

Kubesa, O., K. Morrissey, S. Mathews, J. Proetta, C. Li, P. Skladal, M. Hepel, “Design of Novel Biosensors for Determination of Phenolic Compounds using Catalyst-Loaded Reduced Graphene Oxide Electrodes”, *Mediterr. J. Chem.* **3** (2014) 916–928.

Kulys, J., U. Bilitewsky, R.D. Schmid, “The kinetics of simultaneous conversion of hydrogen peroxide and aromatic compounds at peroxidase electrodes”, *Bioelectrochem. Bioener.* **26** (1991) 277-286.

Laidler, K. J., M. A., Ph. D., F.R.S.C, *Cinética de reacciones*, Alhambra, España, 1972.

Lee, C., X. Wei, J. W. Kysar, J. Hone, “Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene”, *Science* **321** (2008) 385–388.

Lei, W., W. Si, Y. Xu, Z. Gu, Q. Hao, “Conducting polymer composites with graphene for use in chemical sensors and biosensors”, *Microchim. Acta* **181** (2014) 707–722.

Lei, W., W. Si, Y. Xu, Z. Gu, Q. Hao, “Conducting polymer composites with graphene for use in chemical sensors and biosensors”, *Microchim. Acta* **181** (2014) 707–722.

Li, X., A. Zhong, S. Wei, X. Luo, Y. Liang, Q. Zhu, “Polyelectrolyte functionalized gold nanoparticles-reduced graphene oxide nanohybrid for electrochemical determination of aminophenol isomers”, *Electrochim. Acta* **164** (2015) 203–210.

Loryuenyong, V., K. Totepvimarn, P. Eimburanaprat, W. Boonchompoo, A. Buasri, “Preparation and Characterization of Reduced Graphene Oxide Sheets via Water-Based Exfoliation and Reduction Methods”, *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2013** (2013) 1–5.

Lu, D., S. Lin, L. Wang, X. Shi, C. Wang, Y. Zhang, “Synthesis of cyclodextrin-reduced graphene oxide hybrid nanosheets for sensitivity enhanced electrochemical determination of diethylstilbestrol”, *Electrochim. Acta* **85** (2012) 131–138.

Lv, M., X. Wang, J. Li, X. Yang, C. Zhang, J. Yang, H. Hu, “Cyclodextrin-reduced graphene oxide hybrid nanosheets for the simultaneous determination of lead (II) and cadmium (II) using square wave anodic stripping voltammetry”, *Electrochim. Acta* **108** (2013) 412–420.

Marchiando, N. C., M. A. Zon, H. Fernandez, “Characterization of the Surface Redox Process of Adsorbed Cercosporin (CER) at Glassy Carbon Electrodes by Anodic Stripping Square-Wave Voltammetry”, *Electroanalysis* **15** (2003) 40-48.

Matsuda, H., Y. Ayabe. *Z. Electrochem.* **59** (1948) 494-501.

Mecklenburg, M., A. Schuchardt, Y. K. Mishra, S. Kaps, R. Adelung, A. Lotnyk, L. Kienle, K. Schulte, “Aerographite: Ultra Lightweight, Flexible Nanowall, Carbon Microtube Material with Outstanding Mechanical Performance”, *Adv. Mater.* **24** (2012) 3486–3490.

Morozov, S. V., K. S. Novoselov, M. I. Katsnelson, F. Schedin, D. C. Elias, J. A. Jaszczak, A. K. Geim, “Giant Intrinsic Carrier Mobilities in Graphene and Its Bilayer”, *Phys. Rev. Lett.* **100** (2008) 016602-1 016602-4.

Morrison, R. T., R. N. Boyd. *Química Orgánica*, Adison Wesley de México S.A, México, 1998.

Nicholson, R. S., I.Shain, *Anal.Chem.* **36** (1964) 706-723.

Nissum, M., C. B. Schiot, K. G. Welinder, “Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide p H 2,4-12, and veratryl alcohol at pH 2,4”, *Biochim. Biophys. Acta* **1545** (2001) 339-348.

Pattar, V. P., S. T. Nandibewoor, “Electroanalytical method for the determination of 5-fluorouracil using a reduced graphene oxide/chitosan modified sensor”, *RSC Adv* **5** (2015) 34292–34301.

Pumera, M., “Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry”, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 4146-4157.

Randles, J.E.B. *Trans.Faraday Soc* **44** (1948) 322-327.

Ren, P.-G., D.-X. Yan, X. Ji, T. Chen, Z.-M. Li, “Temperature dependence of graphene oxide reduced by hydrazine hydrate”, *Nanotechnology* **22** (2011) 055705 1-8.

Schwarzand, W.M., I.Shain. *Phys.Chem.* **70** (1966) 845-852.

Sher Shah, M. S. A., A. R. Park, K. Zhang, J. H. Park, P. J. Yoo, “Green Synthesis of Biphasic TiO₂–Reduced Graphene Oxide Nanocomposites with Highly Enhanced Photocatalytic Activity”.*ACS Appl. Mater. Interfaces* **4** (2012) 3893–3901.

Stauber, T., N. M. R. Peres, A. K. Geim, “Optical conductivity of graphene in the visible region of the spectrum”, *Phys. Rev. B* **78** (2008) 085432-1 085432-8.

Villalonga, R., C. Camacho, R. Cao, J. Hernández, J. C. Matías, “Amperometric biosensor for xanthine with supramolecular architecture”, *Chem. Commun.* (2007) 942–944.

Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. J. Wiley & Sons, New York, USA, 2003.

Wang, X., X. Zhang, “Electrochemical co-reduction synthesis of graphene/nano-gold composites and its application to electrochemical glucose biosensor”, *Electrochim. Acta* **112** (2013) 774–782.

Welinder, K. G, “Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases”, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2** (1992) 388-393.

Wu B., N. Zhao, S. Hou, C. Zhang, “Electrochemical synthesis of polypyrrolle, reduced graphene oxide, and gold nanoparticles composite and its application to hydrogen peroxide biosensor”, *Nanomaterials* **6** (2016) 220-231.

Zhao Z., H. Jiang, “Enzyme-based biosensors”. Capítulo 1. En Serra Pier (editor). *Biosensors*. 2010. Croacia. Intech.

Zhou, M., Y. Zhai, S. Dong, “Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide”, *Anal. Chem.* **81** (2009) 5603–5613.

CAPÍTULO 3: Reactivos, materiales y métodos

Nuestras herramientas

En el capítulo 3...

En este capítulo se detallará, en primer lugar, cuáles han sido los reactivos utilizados en las medidas experimentales, así como las eventuales síntesis que se debieron realizar. Luego, se describirán los materiales con los que se han podido realizar los experimentos. Después, en la sección de métodos, se desarrollarán los métodos electroquímicos, espectrofotométricos y quimiométricos. También, se describirá el armado de un biosensor enzimático amperométrico y se definirán ciertos conceptos de índole analítica a tener en cuenta para trabajar con biosensores. Finalmente, se encontrará un breve apartado que detalle los métodos complementarios utilizados en algunas ocasiones.

3.1. Reactivos

3.1.1. Eugenol, isoeugenol y vainillina

EUG, IEUG y VAI se adquirieron comercialmente de Sigma-Aldrich y fueron utilizados tal como se recibieron. EUG, con una pureza del 99 % e IEUG, del 98 %, es una mezcla de los isómeros cis-trans. Se realizaron fracciones que fueron conservadas, bajo atmósfera inerte de nitrógeno a 8 °C en heladera. VAI, con una pureza del 99 %, es un sólido, que fue conservado a 8°C en heladera, sin mayores precauciones.

3.1.2. Soluciones patrones de eugenol, isoeugenol y vainillina

Se prepararon soluciones patrones de EUG e IEUG en etanol absoluto (EtOH), marca SINTORGAN, grado HPLC, a partir de una de las fracciones del frasco comercial. Las mismas fueron conservadas en la heladera y en frascos color caramelo. La concentración de esos patrones (tomando en cuenta los datos proporcionados en la botella comercial) fue de 0,64 M. Diariamente se prepararon diluciones (según la concentración a utilizar en cada experimento) en SRF de diferentes pH o en 1 M HClO₄.

Para VAI se preparó un patrón en EtOH, de concentración 0,56 M. Se conservó en la heladera. Al igual que en el caso de EUG e IEUG, diariamente, se prepararon diluciones en SRF o en 1 M HClO₄, según el día de trabajo.

3.1.3. Electrolitos soporte

- ***Soluciones reguladoras de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄***

Con el fin de generar distintos medios de reacción acuosos y de proveer el electrolito soporte, se prepararon diferentes soluciones reguladoras de pH de concentración 0,2 M, a partir de Na₂HPO₄·2H₂O y NaH₂PO₄, marca MERCK p. a. Los valores de pH fueron ajustados con HClO₄ o bien con NaOH, y medidos con un peachímetro, marca Radiometer PHM64, que se calibra diariamente con soluciones reguladoras de pH comerciales.

- ***Ácido perclórico***

Para desarrollar un estudio en un medio fuertemente ácido se trabajó con ácido perclórico (HClO₄), marca Merck, ACS ISO, 70-72%.

3.1.4. Peroxidasa de soja

La EPS fue cedida gentilmente por el Dr. Gustavo J. Levin, Centro de Investigaciones y Transferencia de Entre Ríos (CITER)-CONICET-UNER, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

3.1.5. 1-ácido carboxílico adamantano y EDAC

El 1-ácido carboxílico adamantano (ADA) fue adquirido de Aldrich y (N-3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) fue adquirido de Sigma.

3.1.6. Conjugado 1-ácido carboxílico adamantano con la enzima peroxidasa de soja

La síntesis del conjugado EPS-ADA se realizó en base al método propuesto por Lu y col. (2013). Así, una mezcla de reacción compuesta por 750 µL de la EPS 1,55 x 10⁻⁴ M, 27 mg de ADA (0,031 M) y 50 mg EDAC (0,05 M) en 5 mL de una 0,2 M SRF, pH 6, fue agitada durante toda la noche en la heladera a 4 °C. Luego, la mezcla de reacción fue dializada en 0,2 M SRF pH 6, en heladera, durante tres días. El conjugado se mantuvo en el freezer mientras no fue utilizado.

3.1.7. Peróxido de hidrógeno

Como sustrato de la EPS se utilizó H₂O₂, marca Merck, p.a.

3.1.8. Óxido de grafeno

El OG utilizado para modificar los ECV se sintetizó a partir de escamas de grafito, mediante el uso de un método mejorado del desarrollado por Marcano y col. (2010). Brevemente, el método fue el siguiente: se añadieron 9,0 g de KMnO₄ a una mezcla de H₂SO₄/H₃PO₄ concentrado (180:20 mL) mientras se agitó. Después, se añadieron 1,5 g de escamas de grafito para formar una suspensión uniforme, que se agitó y calentó a 50 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió a 5 °C y se vertió sobre hielo (200 mL) con 30 % de H₂O₂ (1,5 mL). El filtrado se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 h y el sólido amarillo restante se lavó varias veces con una solución de HCl al 30 % v/v y, por último, con tres porciones de etanol libre de agua (100 mL). El sólido resultante se lavó con agua de Tipo I (18 MΩ cm⁻¹) y se colocó en una solución al 10 % de la sal trisódica del ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) a un pH de alrededor de 8 para eliminar los iones divalentes. Después, la mezcla se dializó frente a una solución acuosa de HCl (0,05 M) durante 24 h y, finalmente, se dializó contra agua de Tipo I durante 72 h (membrana de diálisis de corte 6-8 kDa; Viking C65).

3.1.9. Betaciclodextrina

La βCD, con una pureza del 97 %, se adquirió comercialmente de Sigma.

3.1.10. Compósito óxido de grafeno reducido químicamente-betaciclodextrina

El compósito de óxido de grafeno reducido químicamente-betaciclodextrina (OGRQ-βCD) se sintetizó de la siguiente manera (Guo y col., 2011): en un frasco de vidrio (20 mL de capacidad), una porción de 5 mL de la dispersión de OG homogénea (0,5 mg mL⁻¹) se mezcló con 5 mL de una solución acuosa de βCD (80 mg mL⁻¹) y 375 μL de solución de amoníaco (28 %), seguido por la adición de 10 μL de solución de hidracina (50% p/p). Después de agitarse vigorosamente durante unos pocos minutos, la mezcla se llevó en un baño de agua a 60 °C durante 3,5 h. Después de dejar enfriar a

temperatura ambiente, la dispersión se centrifugó y se lavó varias veces con agua destilada para remover los excesos de hidracina y β CD.

3.1.11. Nanopartículas de oro

La síntesis de las NPsAu se realizó mediante un método electroquímico. Así, el método se basó en sumergir el electrodo de trabajo en una solución 5×10^{-4} M HAuCl_4 en 0,1 M SRF de pH 7,00 y aplicar un potencial durante un cierto tiempo. Mediante un diseño experimental se estudió la variación en la respuesta del biosensor debido a cambios en el E_a y el tiempo de electrodeposición.

3.2. Materiales

3.2.1. Celda electroquímica de tres electrodos

Para las medidas electroquímicas se utilizó una celda de vidrio de tres electrodos: ET, ER y CE, de un solo compartimento de base plana.

Para el caso de las medidas a temperatura constante (sección 4.1.6.3) la celda electroquímica fue una celda termostatazada. Se utilizó un criostato, marca Cole Parmer, Modelo 12108-15.

3.2.2. Electrodo de trabajo

Las medidas electroquímicas fueron llevadas a cabo con ECV (marca CH Instruments, área geométrica, $A = 0,071 \text{ cm}^2$), ya sea desnudos o modificados según el tipo de experimento a realizar. En todos los casos, el pre-tratamiento de los ECV desnudos consistió en un pulido mecánico con pasta de diamante durante un minuto, luego se enjuagó con agua destilada y se sometió a un baño de ultra-sonido en agua durante un minuto.

3.2.2.1. Electroodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

Para los ECV/OGPRE, el pre-tratamiento inicial fue igual al de los ECV desnudos descrito en la sección 3.2.2. A continuación, se secaron los electrodos con una corriente de nitrógeno (o argón, en su defecto) y se agregó sobre los mismos una gota de OG. Posteriormente, fueron llevados a la estufa a 37 °C durante treinta minutos. La generación del OGPRE se llevó a cabo a través de barridos catódicos de potencial en una solución 0,2 M SRF pH 7,00 (ver sección 3.3.3.1).

3.2.3. Electrodo de referencia

En todas las medidas electroquímicas el ER fue un electrodo de Ag/AgCl, 3 M NaCl en agua.

3.2.4. Contra-electrodo o electrodo auxiliar

El CE utilizado en todas las experiencias fue un alambre de platino, que contaba con un área geométrica unas 28 veces mayor que la del ET ($A \cong 2 \text{ cm}^2$).

3.2.5. Potenciostatos

Las medidas electroquímicas, en lo que concierne a VC, se llevaron a cabo en un potenciostato Micro AUTOLAB PGSTAT 101, operado bajo el software NOVA 1.9. Para las medidas amperométricas se utilizó un potencióstato marca EPSILON, con software electroquímico incorporado.

3.2.6. Medidas espectrofotométricas

Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible, marca Hewlett Parckard, modelo HP8453. Las celdas de cuarzo tuvieron un camino óptico de 1 cm.

3.2.7. Microscopio de barrido electrónico

Las imágenes de microscopio de barrido electrónico (SEM) se registraron con un microscopio de barrido electrónico de campo de emisión marca Zeiss, modelo IGMA.

3.2.8. Microscopio de fuerza atómico

Las imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) se obtuvieron por medio un “Agilent Technologies 5500 AFM”, trabajando en un modo acústico utilizando pruebas de Si con constantes de fuerza de alrededor de 40 N m^{-1} y una frecuencia en un intervalo de 300-350 kHz.

3.3. Métodos

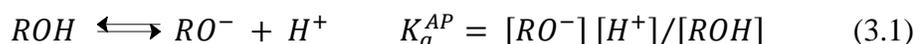
3.3.1. Métodos electroquímicos

Como métodos electroquímicos se emplearon VC, amperometría y EIE.

3.3.2. Métodos espectrofotométricos

3.3.2.1. Determinación de la constante de acidez aparente de los antioxidantes

Para determinar las constantes de acidez aparente (K_a^{AP}) de EUG, IEUG y VAI, respectivamente, se registraron los espectros de absorción UV-Visible de los mismos a distintos valores de pH. Los parámetros desconocidos del sistema, tales como los coeficientes de extinción molar de las distintas especies presentes en solución (ϵ) y las correspondientes K_a^{AP} , se pueden estimar ajustando la variación experimental de la absorbancia (A) en función del pH, a la λ donde presenta menor error el ajuste no lineal, con la ecuación teórica exacta que describe el sistema. Así, lo primero es plantear las ecuaciones teóricas que describen el sistema. Tanto para EUG, IEUG como para VAI (ácidos monopróticos), se tiene el siguiente sistema:



donde los corchetes representan las concentraciones molares de las especies en equilibrio, que se relacionan con la concentración analítica, c_{ROH}^* , a través de la siguiente expresión:

$$c_{ROH}^* = [ROH] + [RO^-] \quad (3.2)$$

Considerando el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, la absorbancia a una dada λ , A^λ , se puede expresar de la siguiente manera:

$$A^\lambda = \varepsilon_{ROH}^\lambda b[ROH] + \varepsilon_{RO^-}^\lambda b[RO^-] \quad (3.3)$$

cuya solución analítica exacta se obtiene expresando la concentración de cada especie en equilibrio como una función de la constante de disociación ácida aparente y de la c_{ROH}^* :

$$A^\lambda = c_{ROH}^* \left(\frac{\varepsilon_{ROH}^\lambda b 10^{pH} + \varepsilon_{RO^-}^\lambda b K_a^{AP}}{10^{pH} + K_a^{AP}} \right) \quad (3.4)$$

Para las determinaciones, se utilizó un algoritmo en MATLAB, cuyo diagrama de bloques se muestra en la Figura 3.1.

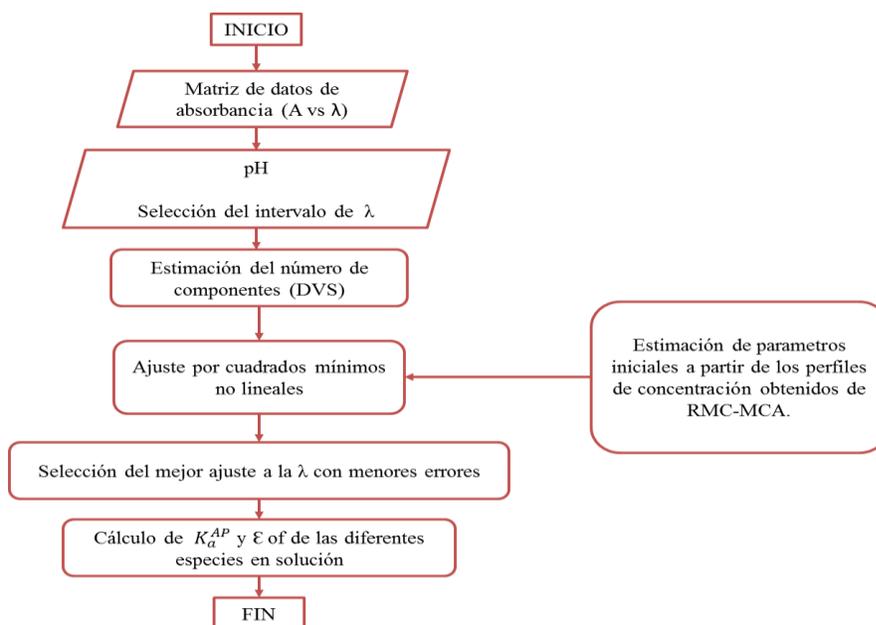


Figura 3.1. Diagrama de bloques que representa el algoritmo escrito en MATLAB.

Brevemente, el procedimiento es el siguiente: se cargan los datos experimentales en MATLAB (A vs λ , para cada valor de pH y a una dada c_{ROH}^*). Es posible analizar el número de componentes principales a través de la descomposición en valores singulares (DVS) de la matriz de los valores de absorbancia, para predecir si la molécula es, efectivamente, un ácido monoprótico (como se deduce de su fórmula molecular) o no. Posteriormente, implementando el algoritmo de resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes (RMC-MCA) (Tauler y col., 1995) se recuperan tanto los perfiles de concentración como los espectros UV-Visible, los que generan información para introducir como estimaciones iniciales de los parámetros de interés en el proceso iterativo de ajuste, a los efectos de llegar a la convergencia. Por último, se ejecuta el algoritmo que contiene las ecuaciones exactas y, a partir del mismo, se determina a qué longitud de onda existe el menor error del ajuste para determinar los parámetros finales.

La resolución multivariada de curvas (RMC) tiene como finalidad aislar, resolver y cuantificar las fuentes de variabilidad presentes en un determinado conjunto de datos. Así, permite analizar las respuestas en todo el espectro de absorción UV-Visible. El término MCA, que significa mínimos cuadrados alternantes, hace referencia a un algoritmo de optimización.

La RMC puede utilizarse para resolver datos cinéticos registrados usando espectrofotometría UV-Visible, tanto de los analitos de interés como eventuales interferentes.

La condición habitual, cuando se utiliza RMC, es que los datos sigan un modelo lineal, es decir la ley de Lambert-Beer para datos espectroscópicos, lo cual puede expresarse como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{cS}^T + \mathbf{E} \quad (3.5)$$

donde \mathbf{D} es la matriz de datos adquiridos a diferentes valores de cierta variable (λ , pH, tiempo, etc.), \mathbf{c} y \mathbf{S}^T están relacionadas con las concentraciones y los perfiles de respuesta puros de las variables presentes en el sistema, respectivamente, y \mathbf{E} es la matriz de los residuales, que contiene información no explicada por el producto \mathbf{cS}^T .

3.3.2.2. Determinación de la concentración de enzima y de peróxido de hidrógeno

La c_{ENZ}^* se determinó por espectrofotometría UV-Visible, midiendo la absorbancia a $\lambda = 403 \text{ nm}$, donde $\varepsilon = 0,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mientras que en el caso del H_2O_2 , la absorbancia se midió a $\lambda = 240 \text{ nm}$, donde $\varepsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Agostini y col., 1997).

3.3.2.3. Cinética enzimática

Con el objetivo de verificar la hipótesis de que cada uno de los tres antioxidantes estudiados podría ser sustrato de la EPS, se procedió a estudiar la cinética de la reacción enzimática. Para el análisis de los datos cinéticos se empleó el método diferencial y, en particular, se utilizó el “método de las velocidades iniciales” (Laidler y col., 1972), siguiendo la desaparición de EUG, IEUG o VAI (a través de las medidas espectrofotométricas) en el tiempo y determinando las pendientes en los primeros instantes de la reacción.

Si se considera:

$$v = -dc/dt \quad (3.6)$$

bastará con obtener los perfiles de concentración en función del tiempo, a partir de los espectros de absorción, para poder estimar las velocidades iniciales de las diferentes reacciones enzimáticas puestas en marcha a través de la variación de diferentes factores, con el objetivo de encontrar las mejores condiciones y, si es posible, las condiciones óptimas en que debe desarrollarse la cinética enzimática (sección 3.3.3.2).

3.3.3. Métodos quimiométricos

La palabra **quimiometría** quiere resumir el concepto de medida en química, lo cual siempre ha sido el papel desempeñado por la Química Analítica. La Quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. La Quimiometría utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines. Por todo ello, la Quimiometría se sitúa en un campo interdisciplinar (Kuehl, 2001). Cuando se hace referencia a experimentos quimiométricos, se incluye la calibración multivariada, el reconocimiento de pautas y el **diseño experimental**.

Muchos químicos consideran a los contrastes estadísticos como métodos que sólo se utilizan para evaluar los resultados cuando el experimento ha sido concluido. Si bien esta es un área de aplicación esencial de la Estadística, es necesario también ser conscientes de la importancia de los conceptos estadísticos en la planificación y el diseño de experimentos.

El diseño estadístico de experimentos es la forma más eficaz de hacer pruebas. Consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder a los interrogantes planteados y, de esa manera, clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema y realizar mejoras (Brereton, 2003).

La optimización experimental puede ser un problema complejo. Leardi (2009) sostiene que si, para un determinado experimento, se lleva a cabo la “optimización” a través del análisis clásico (una variable por vez), donde la respuesta es investigada para cada factor, manteniendo los otros en un nivel constante, no se tiene la garantía de que el óptimo real sea encontrado, porque ello implicaría que las variables a optimizar sean completamente independientes entre sí. El método tradicional de optimización, además de no tener en cuenta las interacciones, implica un mayor número de experimentos, provee un conocimiento local, sólo en los experimentos que realmente se han hecho y, además, no garantiza que se encuentre la posición del óptimo.

En cambio, la estrategia multivariada permite obtener mayor información, consumiendo menos tiempo, esfuerzos y recursos, mientras que el número de experimentos seleccionados y planificados se reduce (Kuehl, 2001).

El término diseño experimental se refiere a la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planificadas adecuadamente.

Resulta apropiado definir ciertos términos que serán utilizados más adelante:

- **Experimento:** cambio en las condiciones de operación de un sistema o proceso, que se hace con el objetivo de medir el efecto del cambio sobre una o varias propiedades del producto o resultado.
- **Factor/variable:** cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en el experimento.

- **Factor/variable de salida:** respuesta.
- **Factor/variable controlado o de entrada:** el experimentador puede alterarlo a su voluntad.
 - **cualitativo:** sus valores no se pueden ordenar numéricamente (dicotómicas y categóricas)
 - **cuantitativo:** sus valores se pueden ordenar numéricamente.
- **Niveles:** diferentes valores que toma un factor. Los diferentes niveles que se les asignen a un factor dependen de la experiencia y conocimiento del experimentador. Siempre se deben elegir, por lo menos, dos condiciones diferentes. Es importante la separación que se elija. Cuando no se conocen se deben hacer ensayos preliminares, luego reescalar y volver a corregir el experimento.
- **Tratamiento-punto de diseño:** combinación de niveles de todos los factores estudiados (Miller y Miller, 2002).

Por otra parte, se discutirán las principales características de los aspectos más relevantes a la hora de trabajar con diseño experimental:

Diseño factorial completo y fraccionado: en la etapa de selección de factores, en general, se utiliza este tipo de diseño. Cuando una variable de respuesta se mide para todas las combinaciones posibles de los niveles elegidos de los factores, se dice que se está utilizando un diseño factorial completo 2^k (el resultado de 2^k representa el número de experiencias a realizar durante el experimento). También, existe el diseño factorial fraccionado (DFF) 2^{k-p} , donde el dos implica los dos niveles (bajo-alto), k es el número de factores considerados y p es el número de veces que se fracciona el diseño.

ANOVA: no se debe perder de vista que los resultados experimentales son muestrales, no poblacionales. Por ello, se debe recurrir a métodos estadísticos inferenciales para ver si las diferencias o efectos muestrales (experimentales) son lo suficientemente grandes para que garanticen diferencias poblacionales (o a nivel proceso). La técnica estadística central en el análisis de los experimentos es el llamado análisis de la varianza ANOVA (acrónimos en inglés).

Metodología de la superficie de respuesta (MSR): originada por el trabajo de Box (estadístico) y Wilson (químico) en 1951, constituye un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El propósito inicial de esta técnica es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema.

En MSR es importante contar con una visión de la región experimental y de la región de operabilidad ya que, en principio, el punto óptimo se puede localizar en cualquier región de la zona de operabilidad, dentro o fuera de la región experimental inicial. La región experimental hace referencia al espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados para cada factor, mientras que la región de operabilidad está delimitada por el conjunto de puntos o condiciones donde el proceso puede ser operado (Figura 3.2).

Como conclusión de los experimentos, siempre se encuentra el mejor tratamiento o la mejor combinación de los niveles de los factores estudiados y, muchas veces éste resulta ser uno de los experimentos que se probaron. El punto óptimo implica que es la mejor combinación posible en toda la región de operabilidad.

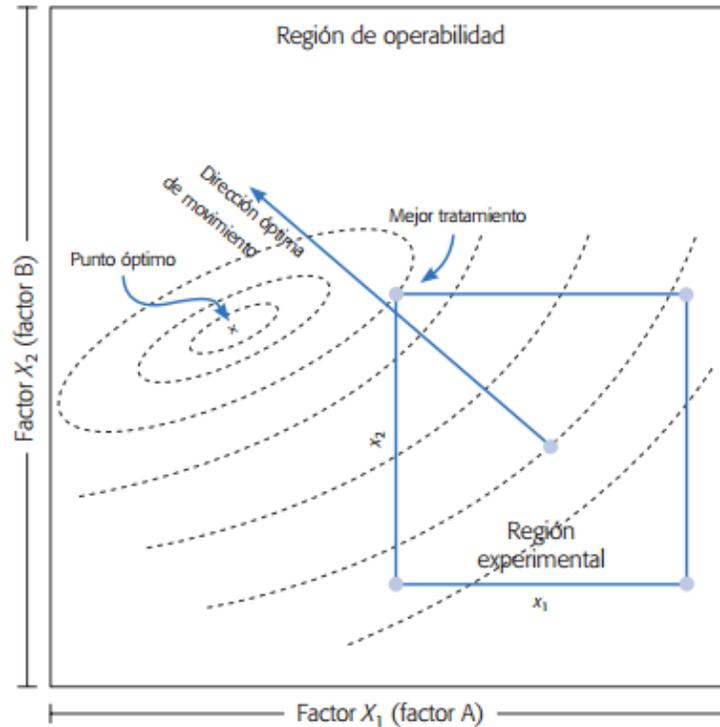


Figura 3.2. *Mejor tratamiento y punto óptimo. Región experimental y región de operabilidad.*

Tipos de diseños en la etapa de MSR: el diseño es el experimento apropiado basado en el conocimiento actual acerca de la posible ubicación del punto óptimo y en el modelo de regresión que se quiere ajustar. Los diseños se clasifican en base al modelo que se pretende utilizar. Proporcionan los tratamientos a correr para generar datos que permitan ajustar un modelo que describa una variable de respuesta en una región experimental. Existe una relación directa entre el tipo de modelo que se pretende ajustar y el diseño que se elige. Un diseño de segundo orden permite ajustar un modelo de segundo orden, para estimar efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Dentro de este tipo de diseños, los más recomendados son el de Box-Behnken y el diseño central compuesto (DCC).

El diseño de Box-Behnken está compuesto por la combinación de diseños factoriales a dos niveles con diseños de bloques incompletos. Puede aplicarse para 3 o más factores.

El DCC se elige debido a que se puede utilizar un factorial completo o fraccionado, agregando puntos sobre los ejes y al centro, además de otras propiedades deseables. El DCC está compuesto por:

- una porción factorial
- un punto central, con n_o repeticiones ($n_o \geq 1$)
- diseño estrella o puntos axiales, a una distancia α del centro

Con k factores, el número total de experimentos es: $N = 2^k + 2k + n_o$. El número de corridas al centro y la distancia de los puntos axiales, se elegirán de acuerdo a las propiedades que se desee del diseño (Pulido y col., 2008).

A continuación, en las secciones 3.3.3.1, 3.3.3.2 y 3.3.3.3 se describirá de qué manera ha sido utilizado el diseño experimental en diferentes instancias experimentales de esta tesis doctoral.

3.3.3.1. En la generación del óxido de grafeno parcialmente reducido

Para encontrar las mejores u óptimas condiciones de generación del OGPRES (sección 3.2.2.1) se utilizó un diseño experimental complejo como el de Box-Behnken, para investigar el efecto de cuatro variables independientes sobre la respuesta de la descarga de un par redox bien conocido, como lo es el ferrocianuro/ferricianuro de potasio y determinar las condiciones que maximizan su $I_{p,a}$ y minimizan el ΔE_p . Las variables independientes significativas seleccionadas fueron: la dilución de OG en agua, el volumen de la gota depositada sobre la superficie del electrodo, la velocidad de barrido de los ciclos reductivos entre 0,100 y -1,700 V vs Ag/AgCl (3 M ClNa) y la cantidad de ciclos correspondientes a la VC. El diseño del modelo consistió en 4 factores a 3 niveles en tres bloques, con 10 experiencias por bloques, contemplando seis puntos centrales. Los niveles de cada factor fueron los que se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Niveles para cada factor en el diseño de Box-Behnken para la optimización de la generación de OGPRE

Factor	Intervalo de niveles trabajados
Velocidad de barrido ($V s^{-1}$)	0,010-0,1
Ciclos reductivos	1-30
Gota depositada (μL)	5,00-10,00
Dilución (mL OG: mL H ₂ O)	0,20-0,66

Finalmente, la optimización numérica, teniendo en cuenta las restricciones impuestas, dieron como resultado que la mejor generación de OGPRE se lograba realizando un depósito de 10 μL de una dilución 0,66 del OG y realizando 30 ciclos reductivos a una velocidad de barrido de 0,052 $V s^{-1}$.

3.3.3.2. En el estudio de la cinética enzimática entre la enzima peroxidasa de soja y los antioxidantes eugenol, isoeugenol y vainillina.

Con el objetivo de encontrar las mejores u óptimas condiciones en que es posible que ocurra la reacción entre la EPS y los co-sustratos (co-s) EUG, IEUG y VAI (sección 3.3.2.3), se trabajó con un DCC con cuatro factores a cinco niveles, para los tres casos por separado. Los factores de entrada controlables que se investigaron fueron: el pH del medio de reacción, la concentración de co-sustrato (c_{co-s}^*), de H₂O₂ ($c_{H_2O_2}^*$) y de la enzima (c_{EPS}^*). Se estudió cómo influyen o afectan estos factores a la variable de salida o respuesta, que es la velocidad inicial de reacción (v_i). Se trabajó con el software Design Expert 7.1. En las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4 se muestran los niveles seleccionados para cada factor para EUG, IEUG y VAI, respectivamente.

Tabla 3.2. Niveles seleccionados para cada factor para EUG para el DCC.

Factor	Niveles				
c_{EUG}^* (μM)	49,5	162,0	274,5	387,0	499,5
$c_{H_2O_2}^*$ (μM)	3	379	755	1131	1507
c_{EPS}^* (nM)	2,5	15,0	27,5	40,0	52,0
pH	5,10	6,10	7,00	8,00	9,00

Tabla 3.3 Niveles seleccionados para cada factor para IEUG para el DCC.

Factor	Niveles				
c_{IEUG}^* (μM)	6	17	28	39	50
$c_{H_2O_2}^*$ (μM)	3	379	755	1131	1507
c_{EPS}^* (nM)	2,5	15,0	27,5	40,0	52,0
pH	5,10	6,10	7,00	8,00	9,00

Tabla 3.4. Niveles seleccionados para cada factor para VAI para el DCC.

Factor	Niveles				
c_{VAI}^* (μM)	9,5	32	54,5	77	99,5
$c_{H_2O_2}^*$ (μM)	4	16	28	40	52
c_{EPS}^* (nM)	2,5	10,0	30,0	40,0	50,0
pH	2,90	3,70	4,20	5,30	5,90

La elección de los extremos en los que podría variar cada factor se relacionó con cuestiones químicas. El extremo superior de c_{Co-S}^* está determinado por el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer. Los valores de $c_{H_2O_2}^*$ y de c_{EPS}^* son aquellos en los que,

normalmente, se desarrollan este tipo de reacciones enzimáticas. Mientras que para el pH se procuró trabajar en un intervalo donde los antioxidantes se encuentren sin disociar.

Para cada antioxidante, se desarrollaron 27 experimentos espectrofotométricos. Para analizar la cinética química y poder calcular v_i , fue necesario utilizar nuevamente el algoritmo RMC-MCA en MATLAB (sección 3.3.2.2), para obtener los espectros y perfiles puros de absorbancia en función del tiempo (o de concentración en función del tiempo), es decir, para cada componente durante el tiempo de reacción (Qi y col., 2015). Luego de que esta metodología permitiera obtener los perfiles de c vs t para cada antioxidante, fue posible calcular los valores de v_i .

En un paso posterior, utilizando nuevamente el software Design Expert 7.1, se obtuvieron los valores de los factores para los cuales se estaba en la presencia de las mejores condiciones para el desarrollo de la reacción enzimática para cada uno de los antioxidantes.

3.3.3.3. En el diseño de un biosensor enzimático amperométrico

En el esquema de la Figura 3.3 se muestran los pasos seguidos para encontrar las mejores condiciones de armado de un biosensor enzimático amperométrico. El objetivo de esta búsqueda es lograr obtener la mayor sensibilidad posible. Así, la variable de salida (o respuesta) a optimizar, mediante el diseño experimental, será la pendiente de una curva de calibración (ΔI_{EE} vs c^*/A M^{-1}) ya sea de H_2O_2 (biosensor para H_2O_2) o de EUG (biosensor para EUG).



Figura 3.3. Esquema de los pasos seguidos para encontrar las mejores condiciones de armado de los biosensores enzimáticos amperométricos para la determinación H_2O_2 y de EUG.

Biosensor para H_2O_2

En primer lugar, se procedió a la *identificación* de los factores implicados en el armado del biosensor. Así, para este paso, se construyó un diagrama de Ishikawa para establecer qué factores son los involucrados en la construcción del biosensor de H_2O_2 (Figura 3.4).

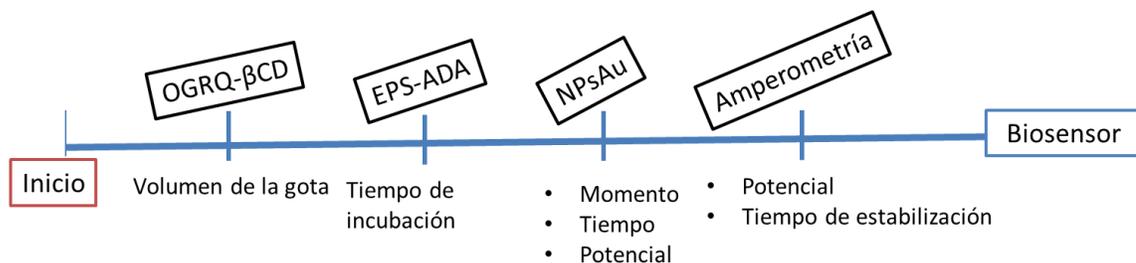


Figura 3.4. Diagrama de Ishikawa que muestra cuáles son los factores considerados en la construcción del biosensor de H_2O_2 .

De la Figura 3.4 se desprende que son 7 los factores implicados desde el inicio hasta el final del armado del biosensor:

- Volumen del compuesto OGRQ-βCD a depositar sobre el ECV.
- Tiempo de incubación del ECV/OGRQ-βCD en EPS-ADA.
- Momento de generación las NPsAu (antes o después de la incubación en EPS-ADA).
- Potencial de electrodeposición de las NPsAu.
- Tiempo de electrodeposición de las NPsAu.
- Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base).
- E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H_2O_2 .

Luego, en segundo lugar, se *seleccionaron* los factores que resultaron significativos (desde un punto de vista estadístico) para la obtención de la máxima sensibilidad. Así, en esta etapa, también llamada “de screening”, se utilizó un DFF, del tipo 2^{7-2} (donde 7 implica el número de factores estudiados y 2 indica cuántas veces se

reduce o fracciona el diseño a la mitad), con una resolución IV, donde la confusión que se produce es que los efectos principales no se confunden entre ellos ni con interacciones dobles, pero sí éstas entre sí. Para cada factor se trabajó con dos niveles: -1 y +1. En total se realizaron 32 experimentos.

En las medidas amperométricas, destinadas a la selección de factores, los agregados de H₂O₂ fueron en un intervalo de 5 x 10⁻⁶ a 2,5 x 10⁻⁵ M. La variable de respuesta a optimizar fue la pendiente de la curva de calibración (ΔI_{EE} vs $c_{H_2O_2}^*/A M^{-1}$). En la Tabla 3.5 se muestran los niveles trabajados para cada factor.

Tabla 3.5 Niveles para cada factor en el DFF. Biosensor de H₂O₂.

Factor	Nivel -1	Nivel +1
Volumen del compuesto OGRQ-βCD a depositar sobre el ECV (μL)	5	10
Tiempo de incubación del ECV/OGRQ-βCD en EPS-ADA (h)	1	16
Momento de generación NPsAu	Antes incubación	Después incubación
Potencial de electrodeposición de las NPsAu (V)	-0,350	0
Tiempo de electrodeposición de las NPsAu (s)	10	90
Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (min)	1	15
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H₂O₂ (V)	-0,3	0,1

En tercer lugar, una vez seleccionados los factores significativos, posteriormente, se pasó a la etapa de *optimización* de los mismos, con el fin, nuevamente, de optimizar la respuesta. Para ello y mediante MSR, se utilizó un DCC, con 5 factores a 5 niveles. La respuesta es, al igual que en la etapa de “screening”, la pendiente de la curva de calibración de H₂O₂. Se realizaron 27 experimentos. Los niveles de los factores significativos trabajados se muestran en la Tabla 3.6. Para la etapa de optimización, se trabajó en el intervalo de concentraciones de H₂O₂ comprendido entre 3 x 10⁻⁵ y 1 x 10⁻⁴ M.

Tabla 3.6. Niveles de los factores significativos en DCC. Biosensor de H₂O₂.

Factor	Niveles				
Volumen OGRQ-βCD (μL)	4,5	6	7,5	9	10,5
Potencial NPAus (V)	-0,380	-0,250	-0,130	0	0,13
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H₂O₂ (V)	-0,65	-0,40	-0,15	0,1	0,35
pH	4,20	5,00	6,10	7,00	8,00

Biosensor para EUG

Al igual que en el caso de H₂O₂, para EUG en primer lugar se procedió a la *identificación* de los factores implicados en el armado del biosensor (Figura 3.5).

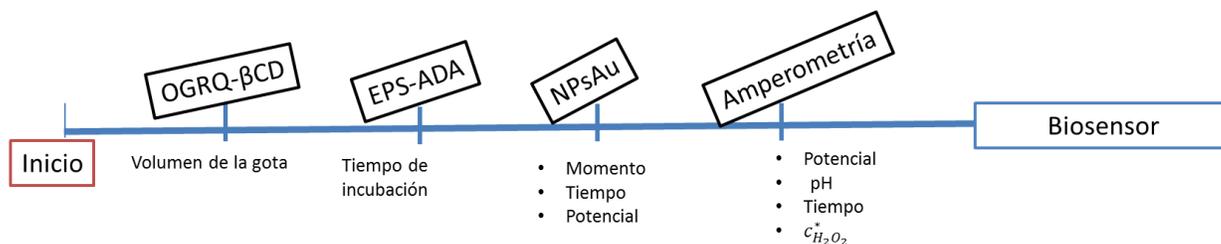


Figura 3.5. Diagrama de Ishikawa que muestra cuáles son los factores involucrados en la construcción del biosensor para EUG.

De la Figura 3.5 se desprende que son 9 los factores implicados desde el inicio hasta el final del armado del biosensor:

- Volumen del compuesto OGRQ-βCD a depositar sobre el ECV.
- Tiempo de incubación del ECV/OGRQ-βCD en EPS-ADA.
- Momento de generación las NPsAu (antes o después de la incubación en EPS-ADA).
- Potencial de electrodeposición de las NPsAu.
- Tiempo de electrodeposición de las NPsAu.
- Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base).
- E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG.
- pH al cual se realizan las medidas amperométricas.
- $C_{H_2O_2}^*$: valor constante, que se adiciona antes de la estabilización.

Luego, en segundo lugar, se *seleccionaron* los factores que resultaron significativos para la obtención de la máxima sensibilidad. Así, se utilizó, al igual que en el caso del H_2O_2 , un DFF del tipo 2^{9-4} . Para cada factor se trabajó con dos niveles: -1 y +1. En total se realizaron 38 experimentos. En las medidas amperométricas los agregados de EUG fueron en un intervalo de 1×10^{-7} a 1×10^{-4} M. En la Tabla 3.7 se muestran los niveles trabajados para cada factor.

Tabla 3.7 Niveles para cada factor en el DFF. Biosensor de EUG.

Factor	Nivel -1	Nivel +1
Volumen del compósito OGRQ-βCD a depositar sobre el ECV (μL)	5	10
Tiempo de incubación del ECV/OGRQ-βCD en EPS-ADA (h)	1	16
Momento de generación NPsAu	Antes incubación	Después incubación
Potencial de electrodeposición de las NPsAu (V)	-0,350	0
Tiempo de electrodeposición de las NPsAu (s)	10	90
Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (min)	10	60
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG (V)	-0,3	0,1
pH al cual se realizan las medidas amperométricas	5,00	8,00
$c_{H_2O_2}^*$ (M)	1×10^{-5}	1×10^{-3}

Los niveles +1 y -1 para cada factor no fueron elegidos arbitrariamente. Cada uno de ellos ha sido seleccionado en base a algún criterio, ya sea por experiencias previas o en base a antecedentes bibliográficos. Así, los niveles elegidos para el volumen del compósito OGRQ-βCD a depositar sobre el ECV tuvieron que ver con el espacio físico

del que dispone el electrodo para receptor dicho compuesto. En el caso del tiempo de incubación del ECV/OGRQ/ β CD en EPS-ADA, se eligió en el tiempo en que la EPS puede saturar. Para el momento de generación de las NPsAu, se discutió que, tal vez, la instancia en que se generen las mismas puede contribuir (o no) a mejorar la transferencia de carga heterogénea. En cuanto al potencial y al tiempo de deposición de las NPsAu, la elección de los niveles elegidos se relacionó con los valores utilizados por Benvidi y col. (2015). Los niveles correspondientes al tiempo de estabilización del ET en una solución con una determinada cantidad de H_2O_2 estuvieron ligados a experimentos propios previos. Una mayor atención requirieron los niveles de E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG. Como se desarrollará en la sección 4.4.5.2, dicho potencial está vinculado con la reducción electroquímica de la quinona, producto de la reacción enzimática entre EUG y EPS. Los pH's a los que se desarrollaron las medidas amperométricas fueron elegidos en función del intervalo de pH en que EPS presenta actividad enzimática (Shi y col, 2010). Además, se consideró el pKa de EUG, para que éste se encontrara en su forma fenólica a para ser censado. El valor de pKa de EUG es de 10,20 (Lopez y col., 2019). Finalmente, los niveles para $c_{H_2O_2}^*$ fueron elegidos en base a las $c_{H_2O_2}^*$ que EPS es capaz de soportar sin que ocurra su inactivación (Shi y col, 2009)

En tercer lugar, se pasó a la etapa de *optimización* de los factores significativos, con la finalidad, nuevamente, de optimizar la respuesta. Se utilizó un DCC con 5 factores a 5 niveles. La respuesta es la pendiente de la curva de calibración de EUG. Se realizaron 29 experimentos. Los niveles de los factores significativos estudiados se muestran en la Tabla 3.8. Se trabajó en el intervalo de concentraciones de EUG comprendido entre 1×10^{-7} y 1×10^{-4} .

Tabla 3.8. Niveles de los factores significativos en DCC. Biosensor de EUG.

Factor	Niveles				
Potencial de electrodeposición de las NPsAu (V)	-0,35	-0,30	-0,17	-0,05	0
Tiempo de electrodeposición de las NPsAu (s)	6	20	55	90	104
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG (V)	-0,30	-0,250	-0,130	0	0,05
Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (min)	4,21	12	31	50	57,79
$c_{H_2O_2}^*$ (M)	$3,6 \times 10^{-5}$	2×10^{-4}	6×10^{-4}	1×10^{-3}	$1,16 \times 10^{-3}$

3.3.4. Preparación del biosensor

A continuación, se describen los pasos seguidos para la construcción de un biosensor enzimático amperométrico basado en la inmovilización del conjugado EPS-ADA sobre un ECV modificado con un compuesto OGRQ- β CD y NPsAu para la detección de H_2O_2 o de EUG.

1. **Déposito del compuesto OGRQ-βCD:** se depositó un determinado volumen de un compuesto OGRQ-βCD sobre el ECV, previamente limpio. Se obtiene así el ECV/OGRQ-βCD.
2. **Generación de las NPsAu:** se aplica un determinado potencial durante un dado tiempo. Existen dos alternativas en cuanto al momento de la generación de las NPsAu. Para la alternativa “1” se deben electrodepositar las NPsAu *antes* y para la alternativa “2” *después* de la incubación en el conjugado EPS-ADA. Para la alternativa 1 se obtiene el ECV/OGRQ-βCD/NPsAu. Para la alternativa “2” se obtiene el ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu.
3. **Incubación en el conjugado EPS-ADA:** el ECV/OGRQ-βCD/NPsAu (alternativa “1”) se lava con una solución 0,2 M SRF pH 7,00. Luego, se lleva a cabo la incubación en una solución de EPS-ADA, durante un dado tiempo. Así, se obtiene el ECV/OGRQ-βCD/NPsAu/EPS-ADA. Nuevamente, se lava el ET en 0,2 M SRF, pH 7,00, para remover los restos del conjugado que no se hayan unido a las βCD. En el caso de la alternativa “2”, el ECV/OGRQ-βCD se pone a incubar el tiempo adecuado. Luego, se lava el ET con una solución 0,2 M SRF pH 7,00 y se generan las NPsAu como se describió anteriormente. De esta manera, el biosensor está en condiciones para ser usado en las medidas amperométricas (Figura 3.6).
4. **Medidas amperométricas.**
 - i. **Para H₂O₂.** Se sumerge el biosensor en una celda electroquímica con una solución 0,2 M SRF de pH 7,00. Bajo agitación magnética, al potencial correspondiente, se deja correr un tiempo para lograr la estabilización de la corriente (corriente de base). Luego, y sin remover el biosensor de la celda, se procede a realizar los diferentes agregados de H₂O₂.
 - ii. **Para EUG.** Se sumerge el biosensor en una celda electroquímica con una solución 0,2 M SRF de pH 7,00. Bajo agitación magnética, al potencial correspondiente y bajo una determinada $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^*$, durante un tiempo para lograr la estabilización de la corriente (corriente de base). Luego, y sin remover el biosensor de la celda, se procede a realizar los diferentes agregados de EUG.

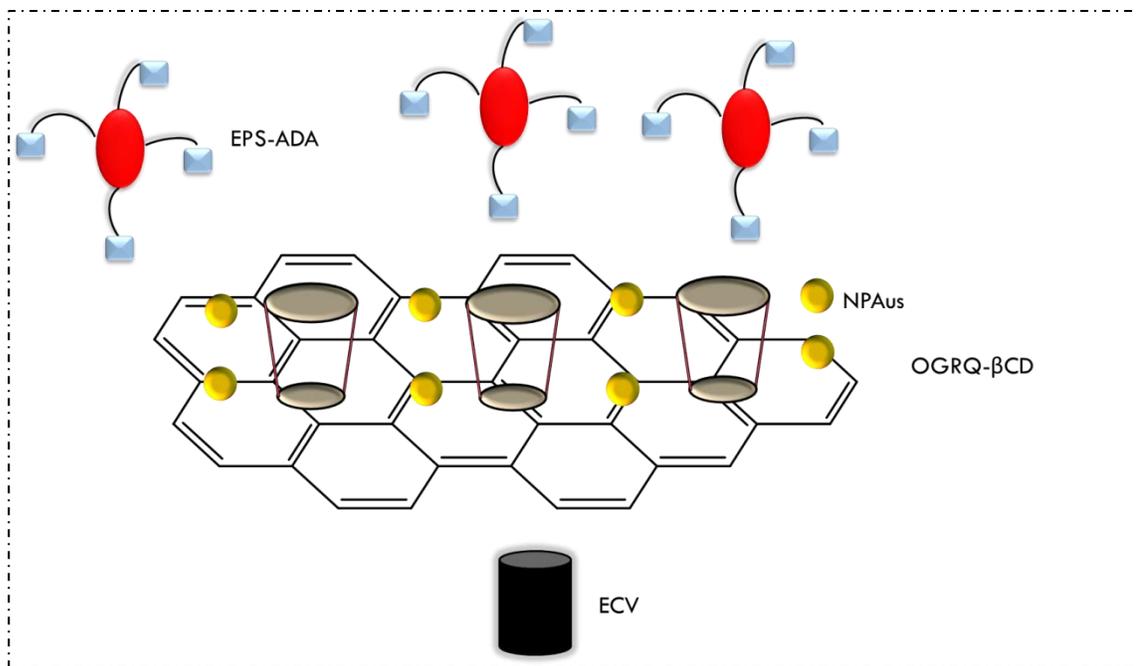


Figura 3.6. Representación del armado del biosensor.

3.3.5. Cuestiones analíticas

Las **cifras de mérito** de un método analítico se utilizan regularmente con el propósito de calificar un determinado método y comparar sus propiedades analíticas con las provistas por otras técnicas (Olivieri y Goicoechea, 2007). Incluyen, entre otras, las que se describen a continuación.

- **Sensibilidad de calibración:** es igual a la pendiente de la curva de calibración.
- **Límite de detección (LOD):** es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. En la definición moderna el LOD se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha por una muestra de blanco (s_o). Así:

$$LOD = 3 s_o \quad (3.7)$$

donde

$$s_o = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (3.8)$$

y

$$Q_{XX} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \quad (3.9)$$

donde $s_{y/x}$ es la desviación estándar de la curva de calibración, x_i es la concentración de cada uno de los m patrones de calibrado, \bar{x} es el promedio de las concentraciones de calibrado y A es la pendiente de la curva de calibración.

- **Límite de cuantificación (LOQ):** es la mínima concentración cuantificable de manera confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar del blanco, con lo cual:

$$LOQ = 10 s_o \quad (3.10)$$

- **Intervalo lineal:** comprende desde el LOQ hasta la pérdida de linealidad de la curva de calibración.

3.3.6. Otros métodos utilizados

Métodos teóricos

Para determinar los posibles productos de la oxidación electroquímica de EUG, IEUG y VAI se realizaron cálculos teóricos para evaluar la estabilidad de los mencionados productos. Para ello, se utilizó el método semi-empírico AM1 para la optimización de la estructura y el ZINDO/s para el cálculo de los espectros UV-Visible. Así se calcularon las energías de formación de los posibles productos de oxidación. Los productos más probables son aquellos que presenten una menor energía de formación.

Referencias bibliográficas

Agostini E., S. Milrad de Forchetti , H. Tigier, “Production of peroxidases by hairy roots of *Brassica napus*”, Plant Cell, Tiss. Org. **47** (1997) 177-182.

Benvidi, A., A. Dehghani-Firouzabadi, M. Mazloun-Ardakani, B. Mirjalili, R. Zare, “Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid and folic acid”, J. Electroanal. Chem. **736** (2015) 22-29.

Box, G. E. E, K. B. Wilson, “On the experimental attainment of optimum conditions”, J. Roy. Statist. Soc. Ser. B **13** (1951) 1-45.

Brereton, R., Chemometrics, Wiley, Chichester, England, 2003.

Guo, Y., S. Guo, J. Li, E. Wang, S. Dong, “Cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim”, Talanta **84** (2011) 60–64.

Kuehl, R., “Diseño de experimentos”, Thomson Learning, México, 2001.

Laidler, K. J., M. A., Ph. D., F.R.S.C, Cinética de reacciones, Alhambra, España, 1972.

Leardi, R., “Experimental design in chemistry: a tutorial”, Anal. Chim. Acta **652** (2009) 161-172.

Lopez J.C., M. A. Zon, H. Fernandez, A. M. Granero, S. N. Robledo, “Determination of kinetic parameters of the enzymatic reaction between soybean peroxidase and natural antioxidante using chemometric tolos”, Food Chemistry **275** (2019) 161-168.

Lu, L.M., X-L. Qiu, X-B. Zhang, G-L. Shen, W. Tan, R-Q Yu, “Supramolecular assembly of enzyme on funcionalized graphene for electrochemical biosensing”, Biosens. Bioelectron. **45** (2013) 102–107.

Marcano, D. C., D. V. Kosynkin, J. M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L. B. Alemany, W. Lu, and J. M. Tour, “Improved Synthesis of Graphene Oxide”, ACSNano **4** (2010) 4806–4814.

Miller, J., J. Miller, “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”, Prentice Hall, España, 2002.

Olivieri, A., H. Goicoechea, “La calibración en Química Analítica”, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, 2007.

Pulido, H. G., R. de la Vara Salazar, “Análisis de diseño de experimentos”, Mc Graw Hill, México, 2008.

Qi, Y-B., X-L. Wang, T. Shi, S. Liu, Z-H. Xu, X. Li, X. Shi, P. Xua, Y-L Zhao, ”Multicomponent kinetic analysis and theoretical studies on the phenolic intermediates in the oxidation of eugenol and isoeugenol catalyzed”, *Phys. Chem. Chem. Phys. (RSC)* **44** (2015) 29597-29607.

Shi, L., X. Liu, W. Niu, H. Li, S. Han, J. Chen, G. Xu, “Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of soybean peroxidase immobilized on single-walled carbon nanohotn modified electrode”, *Biosens. and Bioelectronics* **24** (2009) 1159-1163.

Tauler, R., “Multivariate curve resolution applied to second order data”, *Chemometr. Intell, Lab.* **30** (1995) 133-146.

CAPÍTULO 4: Resultados

Nuevos conocimientos

En el capítulo 4...

En este capítulo se discutirán los resultados experimentales obtenidos en el desarrollo de la presente tesis doctoral, en función de los objetivos planteados en un comienzo. Los resultados estarán organizados de la siguiente manera:

- Estudio electroquímico de EUG, IEUG y VAI
- Propiedades de los diferentes electrodos de trabajo utilizados
- Determinación de las K_a^{AP} de cada uno de los antioxidantes y cinética enzimática.
- Biosensores enzimáticos electroquímicos para la determinación de EUG y de H_2O_2

4.1. Estudio electroquímico de eugenol, isoeugenol y vainillina

4.1.1. Eugenol

4.1.1.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo

Durante los primeros estudios electroquímicos relacionados con EUG, se estudió la respuesta sobre ECV, en diferentes medios de reacción, tal como se muestra en la Figura 4.1.

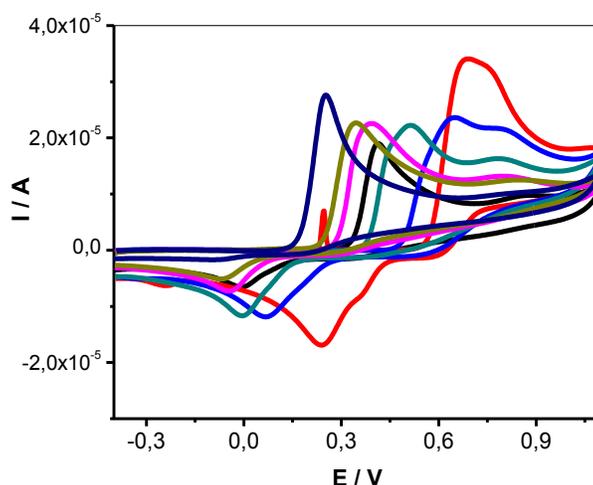


Figura 4.1. Respuestas voltamperométricas de EUG sobre ECV en diferentes medios de reacción: 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,10 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 10,00 y (—) 12,00. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$.

Como se puede observar, EUG presenta, en el primer barrido anódico de potencial, un pico de oxidación y, cuando se invierte la dirección de barrido de potencial, un pico de reducción. Los valores de $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ se desplazan hacia valores menos anódicos a medida que aumenta el pH del medio, lo cual concuerda con lo que se espera para fenoles cuando disminuye la disponibilidad de protones en el medio de reacción (Saglam y col., 2016).

En la Figura 4.2a se muestra la variación de $E_{p,a}$ con respecto al pH. El valor de la pendiente obtenida entre pH 2,00 y pH 8,00 es de $-0,055 \pm 0,008 V / \text{unidad de pH}$ (coeficiente de correlación lineal (r) = 0,9713), el cual, según la ecuación de Nernst,

indica que en el proceso de oxidación de EUG intervienen igual número de protones y de electrones. En tanto, el mejor valor de $I_{p,a}$ se obtuvo para una 0,2 M SRF pH 2,00 (Figura 4.2 b).

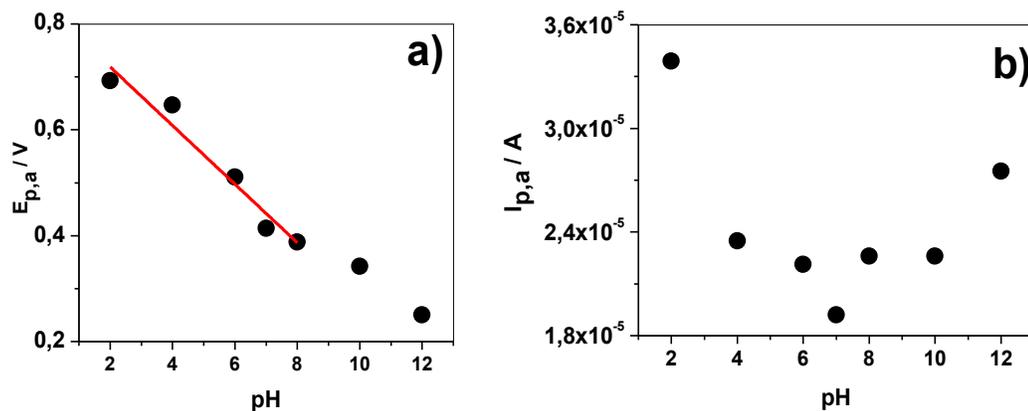


Figura 4.2. Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para EUG sobre ECV. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

4.1.1.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

Se procedió a estudiar la respuesta de EUG sobre el ECV/OGPRE, tras un tiempo de acumulación (t_{ac}), bajo agitación a un potencial de acumulación (E_{ac}) igual a potencial circuito abierto (PCA) en una celda que contenía EUG, $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Una vez transcurrido el tiempo de acumulación, se registró cada voltamperograma en esa misma celda. Cada valor de pH estudiado significó generar un ECV/OGPRE nuevo (Figura 4.3).

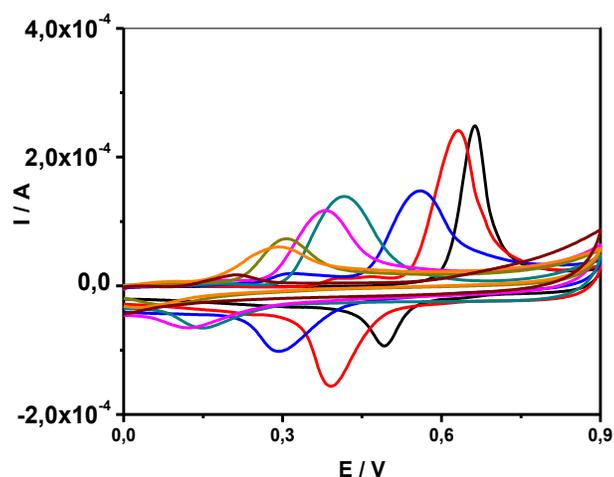


Figura 4.3. Respuestas voltamperométricas de EUG sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO_4 y 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 10,00 y (—) 12,00. $c_{\text{EUG}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{\text{ac}}: 30 \text{ min}$, $E_{\text{ac}} = \text{PCA}$.

Al igual que para ECV, EUG presenta sobre el ECV/OGPRE, en el primer barrido cíclico de potencial, un pico de oxidación y, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, un pico de reducción (no complementario al primero).

Al analizar cómo cambia la respuesta de EUG al variar el pH del medio de reacción, se cumplió el supuesto acerca de que a medida que el pH del medio aumenta, los $E_{\text{p,a}}$ y $E_{\text{p,c}}$ se desplazan hacia valores menos anódicos. Un gráfico de $E_{\text{p,a}}$ en función del pH arrojó una pendiente de $-0,051 \pm 0,003 \text{ V/ unidad de pH}$ ($r = 0,9901$) entre el pH correspondiente a 1 M HClO_4 y una 0,2 M SRF pH 8,00, lo cual mostró que para el mencionado intervalo de pH's estarían involucrados la misma cantidad de electrones y de protones en la oxidación electroquímica de EUG (Figura 4.4a). A partir del punto de corte de dicho gráfico también se pudo predecir que el valor de pKa de EUG estaría alrededor de 10. Este valor concuerda con el resultado obtenido, a través de medidas espectrofotométricas, realizadas en el desarrollo de la presente tesis doctoral (ver sección 4.3.1). En lo que respecta al mejor valor de $I_{\text{p,a}}$, prácticamente, no existen diferencias entre los valores obtenidos para 1 M HClO_4 y para 0,2 M SRF de pH 2,00 (Figura 4.4b).

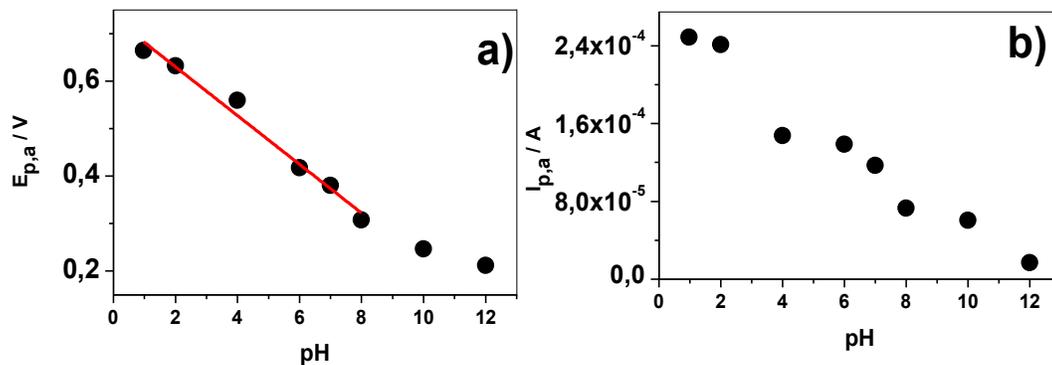


Figura 4.4. Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y de b) $I_{p,a}$ con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

4.1.1.3. Comportamiento electroquímico de eugenol en 1 M HClO₄

En la Figura 4.5 se muestran los voltamperogramas cíclicos de EUG en 1 M HClO₄ registrados a diferentes v . Cada voltamperograma cíclico se registró después de 30 minutos de acumulación, bajo agitación magnética, a PCA. Cada velocidad de barrido significó la generación de un nuevo ECV/OGPRE.

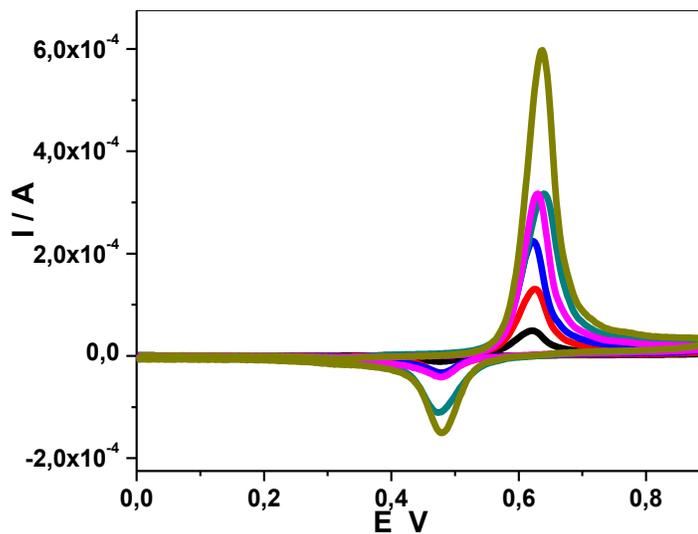


Figura 4.5. Voltamperogramas cíclicos de EUG en 1 M HClO₄ registrados a diferentes velocidades de barrido: (—) $0,020 \text{ V s}^{-1}$ (—) $0,040 \text{ V s}^{-1}$ (—) $0,060 \text{ V s}^{-1}$ (—) $0,080 \text{ V s}^{-1}$ (—) $0,100 \text{ V s}^{-1}$ (—) $0,150 \text{ V s}^{-1}$. $c_{EUG}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

A partir de los perfiles voltamperométricos fue posible inferir que el mecanismo de oxidación electroquímica de EUG sobre ECV mostraría, principalmente, un control adsorptivo. Esto se corroboró a partir del estudio de la variación de $I_{p,a}$ con v . El gráfico de $I_{p,a}$ vs v arrojó un adecuado coeficiente de correlación lineal ($r = 0,9848$), que llevó a sostener la hipótesis del control por adsorción (Figura 4.6).

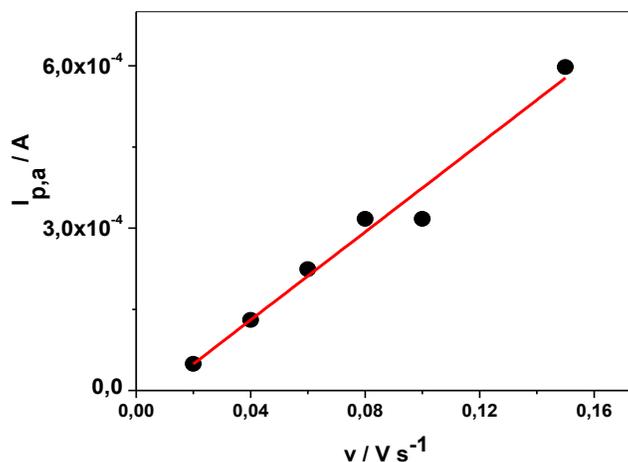


Figura 4.6. Gráfico de $I_{p,a}$ vs v para EUG sobre ECV/OGPRE en 1 M HClO₄.

En la Figura 4.7 se observa un estudio más detallado acerca del mecanismo de oxidación electroquímica de EUG sobre ECV/OGPRE. Así, en negro, se puede observar el voltamperograma cíclico registrado para $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3}$ M en 1 M HClO₄, mientras que, en rojo, se observan diez voltamperogramas cíclicos registrados a continuación del primero.

Como ya se mencionó anteriormente, EUG presenta en el primer barrido anódico de potencial un pico de oxidación (pico I) y, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, un pico de reducción (pico IIc). Se considera que este pico no sería el pico complementario del pico I y que existiría una complicación cinética acoplada a la transferencia de carga inicial.

Cuando se realiza un segundo barrido cíclico aparece un nuevo pico anódico (IIa) a potenciales más bajos que el pico de oxidación principal I. Si los barridos cíclicos continúan, el pico I disminuye en intensidad, mientras que los picos IIa y IIc aumentan.

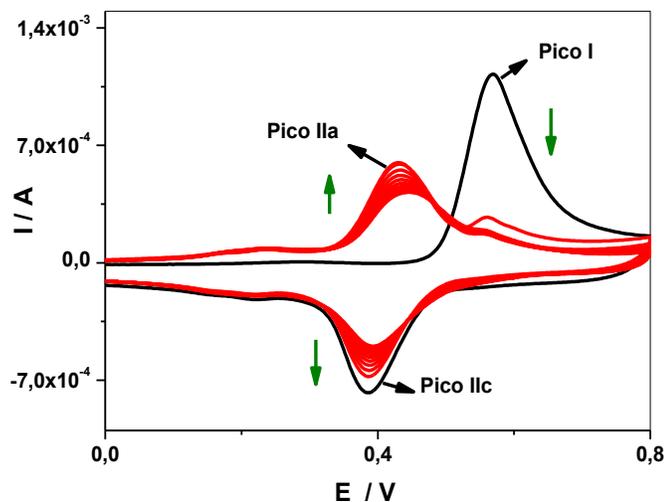


Figura 4.7. Voltamperogramas cíclicos registrados para EUG en 1 M HClO₄: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 4.8 se muestra el voltamperograma cíclico obtenido después de sumergir, posteriormente, el mismo ECV/OGPRE, en una celda electroquímica que contiene sólo 1 M HClO₄. EUG y el/los productos de oxidación quedan adsorbidos sobre la superficie del ET, lo cual puede ser comprendido a partir de la permanencia de los picos IIa y IIc.

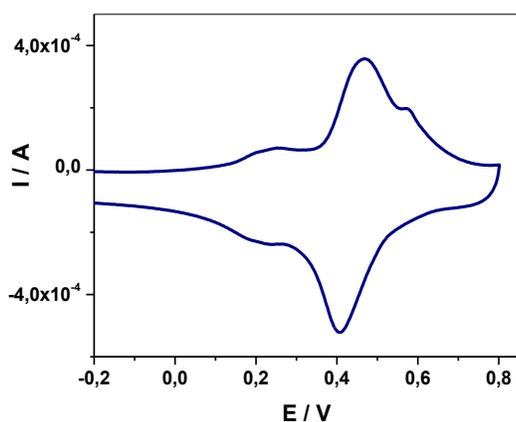


Figura 4.8. Voltamperograma cíclico registrado en 1 M HClO₄ con posterioridad a los voltamperogramas cíclicos mostrados en la Figura 4.7. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.1.2. Isoeugenol

4.1.2.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo

Durante los primeros estudios electroquímicos relacionados con IEUG, se estudió la respuesta sobre ECV, en diferentes medios de reacción, tal como se muestra en la Figura 4.9.

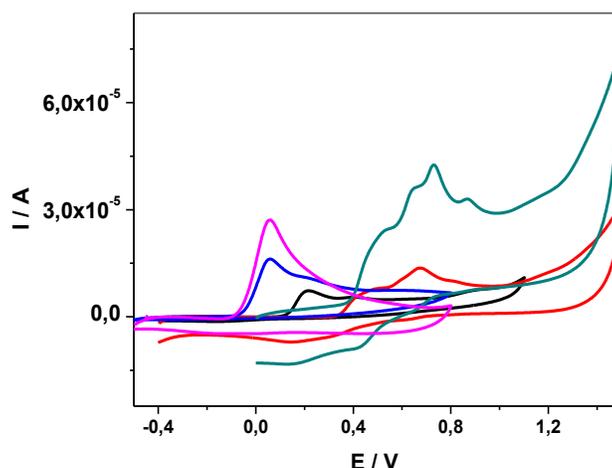


Figura 4.9. Respuestas voltamperométricas de IEUG sobre ECV en diferentes medios de reacción: (—) 1 M $HClO_4$ y 0,2 M SRF pH (—) 2,00 (—) 7,00 (—) 10,00 (—) 12,00.

$$c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}, \nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}.$$

Como se puede observar en la Figura 4.9, tanto el $E_{p,a}$ como el $E_{p,c}$ se desplazan hacia valores menos positivos a medida que aumenta el pH. Esto concuerda con lo esperado acerca de que la respuesta electroquímica de los fenoles se ve afectada por la disponibilidad de H^+ en el medio (Saglam y col., 2016).

En la Figura 4.10a se muestra la variación de $E_{p,a}$ con el pH del medio de reacción. Es posible apreciar un punto de corte a pH 10,00, lo que indica que el pKa de IEUG se encontraría alrededor de este valor. Efectivamente, este valor concuerda con el encontrado, a través de medidas espectrofotométricas, durante el desarrollo de la presente tesis doctoral (ver sección 4.3.1). En la Figura 4.10b se muestra la dependencia de $I_{p,a}$ con

el pH del medio de reacción. Así, $I_{p,a}$ alcanza su máximo valor en un medio extremadamente ácido (1 M HClO₄).

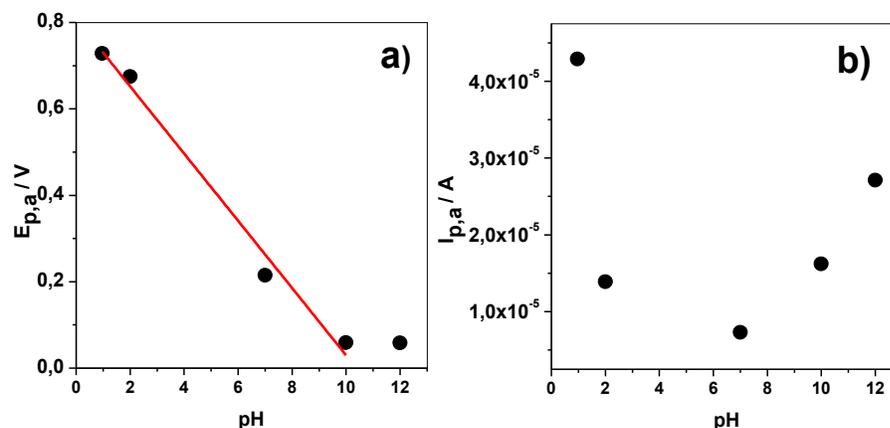


Figura 4.10. Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para IEUG sobre ECV. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

4.1.2.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

Se procedió a estudiar la respuesta de IEUG sobre el ECV/OGPRE, tras un $t_{ac} = 30$ minutos, bajo agitación a un $E_{ac} = PCA$ en una celda que contenía IEUG, $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3}$ M. Una vez transcurrido el tiempo de acumulación, se registró cada voltamperograma en esa misma celda. Cada valor de pH estudiado significó generar un ECV/OGPRE nuevo (Figura 4.11).

En el caso de ECV/OGPRE, puede apreciarse que, a diferencia del ECV, en el primer barrido anódico aparecen dos picos de oxidación (pico III y pico I) a menor y mayor potencial anódico, respectivamente y, además, un pico catódico (en el barrido inverso de potencial, Pico IIc).

Con respecto a los dos picos de oxidación observados en el primer barrido anódico de potencial, es posible proponer que el pico III se trataría de un pre-pico que indica que el producto de la oxidación electroquímica está más fuertemente adsorbido que el reactivo (Bard y Faulkner, 2001).

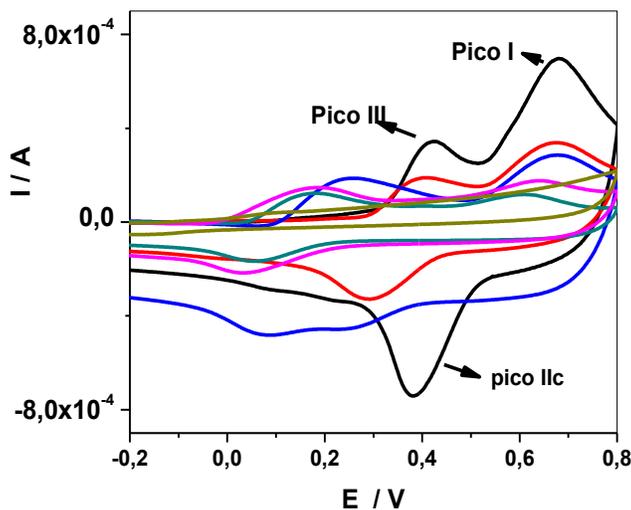


Figura 4.11. Respuestas voltamperométricas de IEUG sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO_4 y 0,2 M SRF pH (—) 2,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 8,00 (—) 11,00. $c_{\text{EUG}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{\text{ac}}: 30 \text{ min}$, $E_{\text{ac}} = \text{PCA}$.

En las Figuras 4.12a y 4.12b se muestra cómo varían el $E_{\text{p,a}}$ (pico I) y el $E_{\text{p,a}}$ (pico III) con respecto al pH, respectivamente.

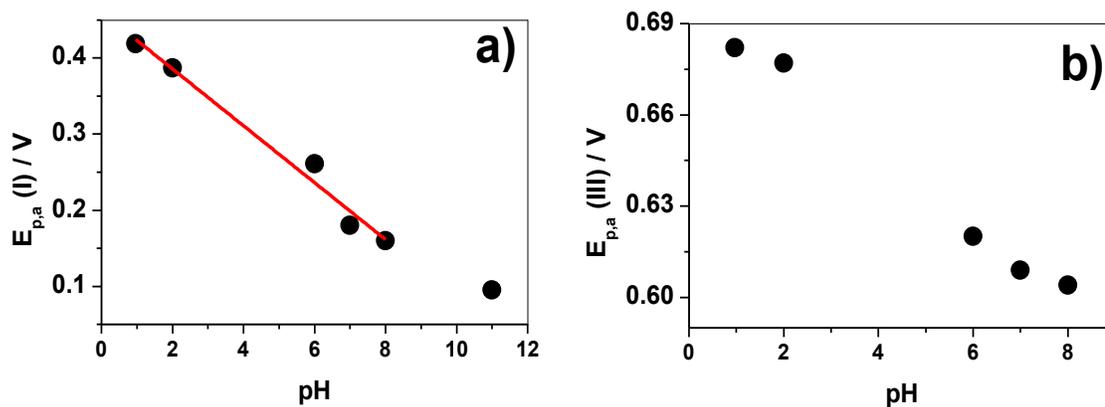


Figura 4.12. Dependencia de: $E_{\text{p,a}}$ (pico I) (a) y del $E_{\text{p,a}}$ (pico III) (b) con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

En base al análisis de la Figura 4.12a, se podría pensar que la relación entre el $E_{p,a}$ (Pico I) y el pH podría ajustarse mediante una recta entre 1 M HClO₄ y pH 10,00.

Por otra parte, las máximas $I_{p,a}$ (ya sea para el pico I y el pico III) se registran en 1 M HClO₄ (Figuras 4.13a y 4.13b).

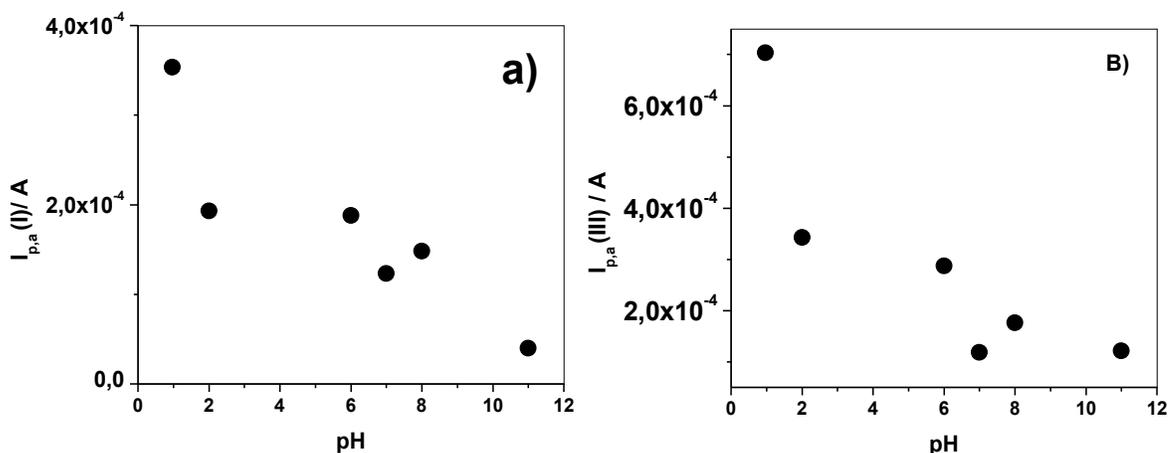


Figura 4.13. Dependencia de: $I_{p,a}$ (Pico I) (a) y de $I_{p,a}$ (Pico III) (b) con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

4.1.2.3. Comportamiento electroquímico de isoeugenol en 1 M HClO₄

En la Figura 4.14 se muestra, en negro, el voltamperograma cíclico registrado para IEUG, en 1 M HClO₄ para $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, durante el primer barrido cíclico de potencial y, en rojo, diez voltamperogramas cíclicos consecutivos, registrados a continuación del primero.

IEUG presenta dos picos de oxidación, picos III y I, situados a menor y mayor potencial anódico, respectivamente, y un pico de reducción (pico IIc), durante el primer barrido cíclico. En los barridos cíclicos posteriores, el pico III desaparece mientras que surge un nuevo pico de oxidación (IIa) y el pico I decrece en intensidad de corriente. A continuación, queda claramente definida una cupla redox quasi-reversible (IIa/IIc) a potenciales menos anódicos que el pico I. Este último comportamiento es semejante al encontrado para EUG.

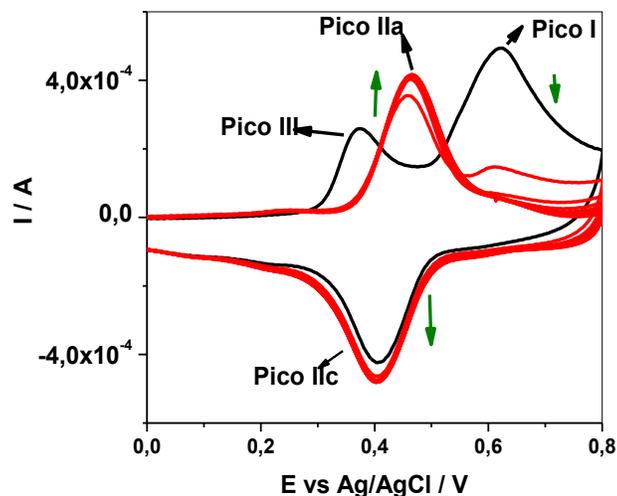


Figura 4.14. Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $C_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$. $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Es posible proponer un mecanismo de descarga adsorptivo del sustrato y del/de producto/s de oxidación sobre la superficie del electrodo. Este comportamiento se puede constatar a partir del voltamperograma cíclico registrado después de transferir el ECV/OGPRE, utilizado anteriormente, a una celda que contiene sólo 1 M HClO₄ (Figura 4.15).

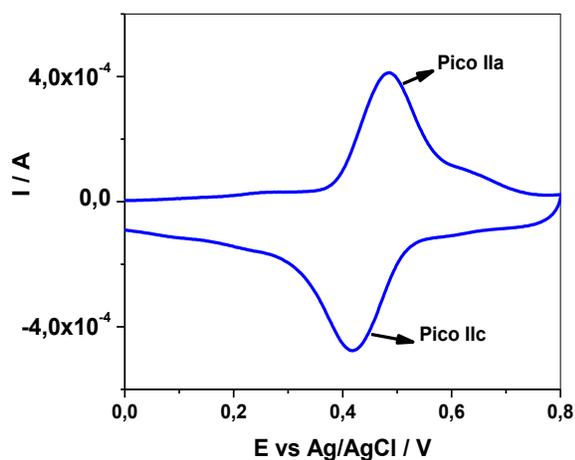


Figura 4.15. Voltamperograma cíclico registrado en 1 M HClO₄ posteriormente a los voltamperogramas cíclicos mostrados en la Figura 4.14.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras la determinación de la relación entre el pico III y los demás picos. En primer lugar, en la Figura 4.16 se muestra, en negro, un voltamperograma cíclico registrado para IEUG en un intervalo de potencial que comprende desde 0 a 0,8 V vs Ag/AgCl. En rojo, se muestra un voltamperograma análogo, con la diferencia de que el intervalo de potencial está comprendido entre 0 y 0,5 V vs Ag/AgCl. Ambos voltamperogramas cíclicos se registraron con dos electrodos diferentes, en 1 M HClO₄ para $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3}$ M a $v = 0,1$ V s⁻¹.

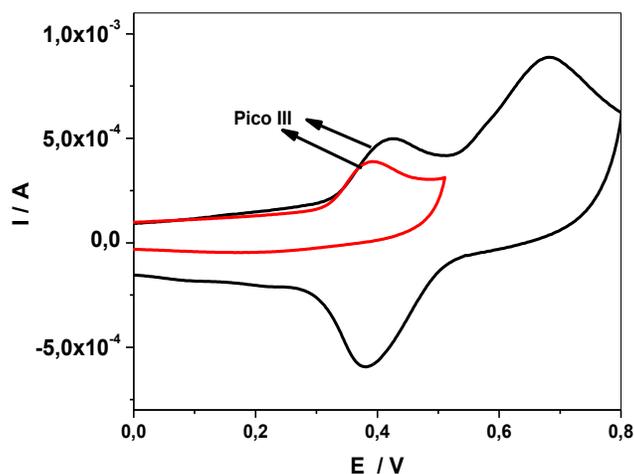


Figura 4.16. Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄ sobre dos ECV/OGPRE distintos. (—) De -0,5 a 0,8 V y (—) de -0,5 a 0,5 V vs Ag/AgCl. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3}$ M, $v = 0,100$ V s⁻¹.

Es posible advertir que, cuando se acota el intervalo de potencial y, solamente, se genera el pico III (voltamperograma rojo, Figura 4.16), ningún pico catódico complementario se obtiene al invertir la dirección del barrido de potencial.

Posteriormente, en la Figura 4.17 se muestran los voltamperogramas cíclicos (en azul) registrados a continuación del voltamperograma rojo de la Figura 4.16. Así, Puede observarse que el pico III tampoco guarda relación con el par redox IIa/IIc y que se pierde todo tipo de señal electroquímica con los ciclos sucesivos. Así, la aparición del par redox IIa/IIc en los barridos cíclicos sucesivos mostrados en la Figura 4.14 pueden ser adscriptos al producto/s de oxidación del pico I. Es decir, se podría proponer que el pico

III no guarda relación con los demás picos de oxidación y reducción registrados inicialmente.

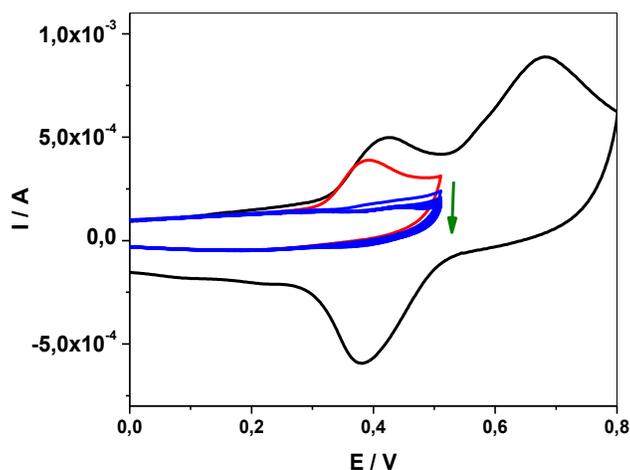


Figura 4.17. Voltamperogramas cíclicos registrados para IEUG en 1 M HClO₄ sobre dos ECV/OGPRE distintos: (—) de 0 a 0,8 V y (—) de 0 a 0,5 V, (—) 10 voltamperogramas cíclicos consecutivos, entre -0,5 y 0,5 V. $c_{IEUG}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.1.3. Vainillina

4.1.3.1. Estudios preliminares en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo

Durante los primeros estudios electroquímicos relacionados con VAI, se estudió la respuesta sobre ECV en diferentes medios de reacción, tal como se muestra en la Figura 4.18.

VAI presenta durante en el primer barrido anódico de potencial, un pico de oxidación y, cuando se invierte la dirección de barrido de potencial, un pico de reducción. Tanto el $E_{p,a}$ como el $E_{p,c}$ se desplazan hacia valores menos anódicos a medida que disminuye la disponibilidad de H^+ en el medio de reacción.

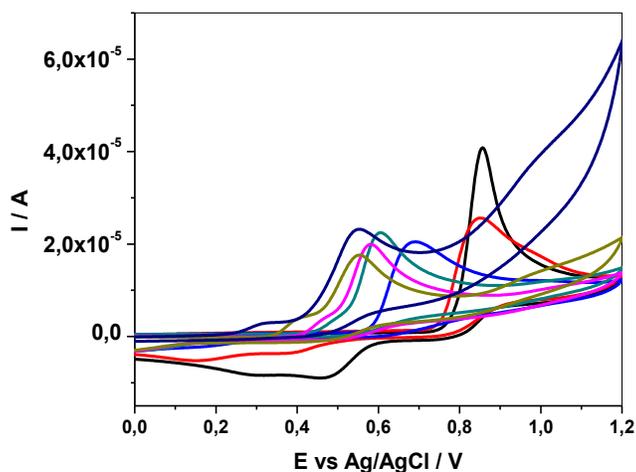


Figura 4.18. Respuestas voltamperométricas de VAI sobre ECV en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO_4 , y 0,2 M SRF pH's (—) 2,00 (—) 4,10 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 9,00 (—) 12,00. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 4.19a se muestra a la variación de $E_{p,a}$ con respecto al pH. El valor de la pendiente obtenida entre pH 2,00 y pH 7,00 es de $-0.050 \pm 0,005 \text{ V/ unidad de pH}$ ($r = 0,9776$), el cual, según la ecuación de Nernst, indica que en el proceso de oxidación de VAI intervienen igual número de protones y de electrones. En el mencionado gráfico, es posible apreciar un punto de corte a, aproximadamente, pH 7,00 lo que indica que el pKa de VAI se encontraría alrededor de este valor. Efectivamente, este valor concuerda con el encontrado, a través de medidas espectrofotométricas, durante el desarrollo de la presente tesis doctoral (ver sección 4.3.1).

Mientras tanto, el mejor valor de $I_{p,a}$ se obtuvo para 1 M HClO_4 (Figura 4.19b).

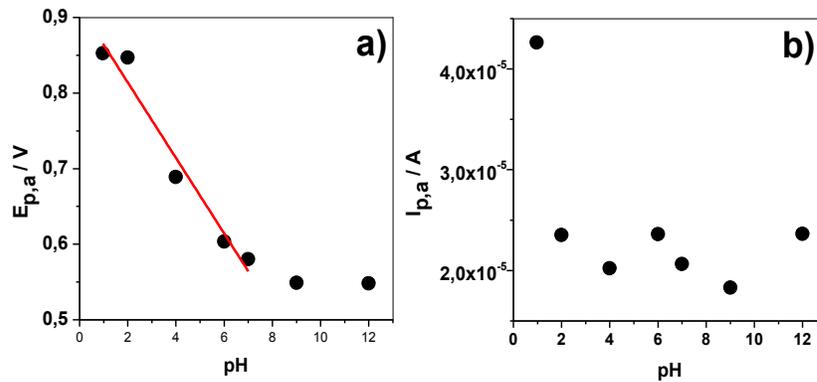


Figura 4.19. Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el pH para VAI sobre ECV. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

4.1.3.2. Estudios en distintos medios de reacción sobre electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

Se procedió a estudiar la respuesta de VAI sobre el ECV/OGPRE, tras un $t_{ac} = 30$ minutos, bajo agitación a un $E_{ac} = PCA$ en una celda que contenía VAI, $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$. Una vez transcurrido el tiempo de acumulación, se registró cada voltamperograma en esa misma celda. Cada valor de pH estudiado significó generar un ECV/OGPRE nuevo (Figura 4.20).

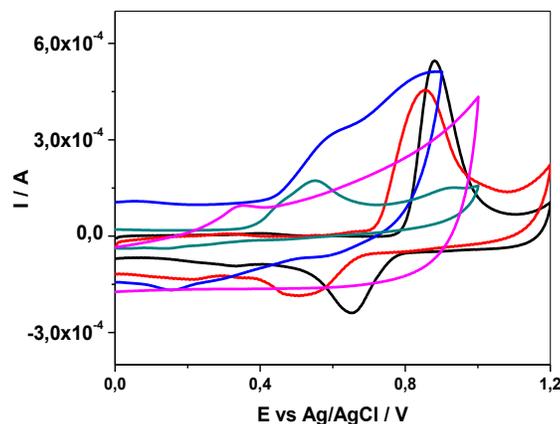


Figura 4.20. Respuestas voltamperométricas de VAI sobre ECV/OGPRE en diferentes medios de reacción: (—) 1 M HClO_4 , y $0,2 \text{ M SRF}$ pH's (—) 2,00 (—) 6,00 (—) 7,00 (—) 12,00. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. $t_{ac}: 30 \text{ min}$, $E_{ac} = PCA$.

Al igual que para ECV, VAI presenta sobre el ECV/OGPRE, en el primer barrido cíclico de potencial, un pico de oxidación y, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, un pico de reducción (no complementario del primero).

Al analizar cómo cambia la respuesta de VAI al variar el pH del medio de reacción se se encontró también que a medida que el pH del medio aumenta los $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ se desplazan hacia valores menos anódicos.

Un gráfico de $E_{p,a}$ en función del pH arrojó una pendiente de $-0,050 \pm 0,004$ V/ unidad de pH ($r = 0,9854$), entre el pH correspondiente a 1 M HClO₄ y una 0,2 M SRF pH 7,00 lo cual mostró que para el mencionado intervalo de pH's estarían involucrados la misma cantidad de electrones y de protones en la oxidación electroquímica de VAI (Figura 4.21a). A partir del punto de corte de dicho gráfico también se pudo predecir que el valor de pKa de VAI estaría alrededor de 7,00. Este valor concuerda con el resultado obtenido, a través de medidas espectrofotométricas, realizadas en el desarrollo de la presente tesis doctoral (ver sección 4.3.1).

En lo que respecta al mejor valor de $I_{p,a}$ se obtuvo para 1 M HClO₄ (Figura 4.21b).

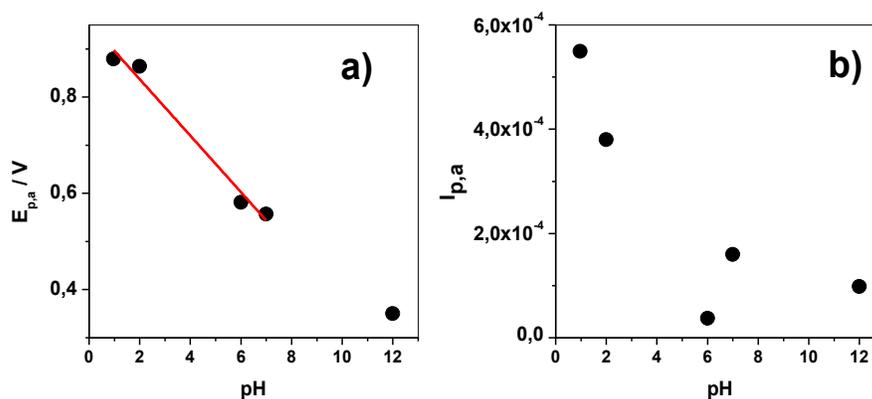


Figura 4.21. Dependencia de: a) $E_{p,a}$ y de b) $I_{p,a}$ con el pH. ET: ECV/OGPRE. $v = 0,1$ V s^{-1} .

4.1.3.3. Comportamiento electroquímico de vainillina en 1 M HClO₄

En la Figura 4.22 se muestra, en negro, el voltamperograma cíclico registrado para VAI, en 1 M HClO₄ para $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3}$ M a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, durante el primer barrido cíclico de potencial y, en rojo, diez voltamperogramas cíclicos consecutivos, registrados a continuación del primero.

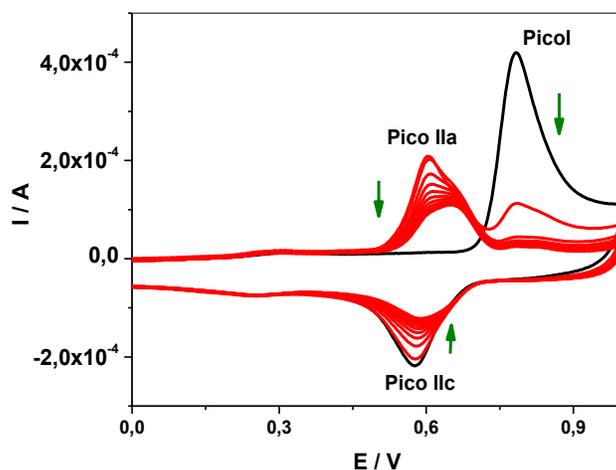


Figura 4.22. Voltamperogramas cíclicos registrados para VAI en 1 M HClO₄: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{VAI}^* = 1 \times 10^{-3}$ M. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Como ya se mencionó con anterioridad, VAI presenta durante el primer barrido anódico de potencial un pico de oxidación (al que se denominará pico I) y, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, un pico de reducción (al que se denominará pico IIc). Se considera que este pico no sería el pico complementario del pico I y que existiría una complicación cinética acoplada a la transferencia de carga inicial.

Cuando se realiza un segundo barrido cíclico aparece un nuevo pico anódico (IIa) a potenciales más bajos que el pico de oxidación principal (Pico I). Si los barridos cíclicos continúan, el pico I disminuye en intensidad, mientras que los picos IIa y IIc aumentan.

En la Figura 4.23 se superponen, a los voltamperogramas mostrados en la Figura 4.22, aquellos obtenidos tras sumergir, posteriormente, el mismo ECV/OGPRE, en una celda electroquímica que contiene únicamente 1 M HClO₄. Se detecta claramente un par redox quasi-reversible, cuyos potenciales son similares a los de los picos IIa y IIc.

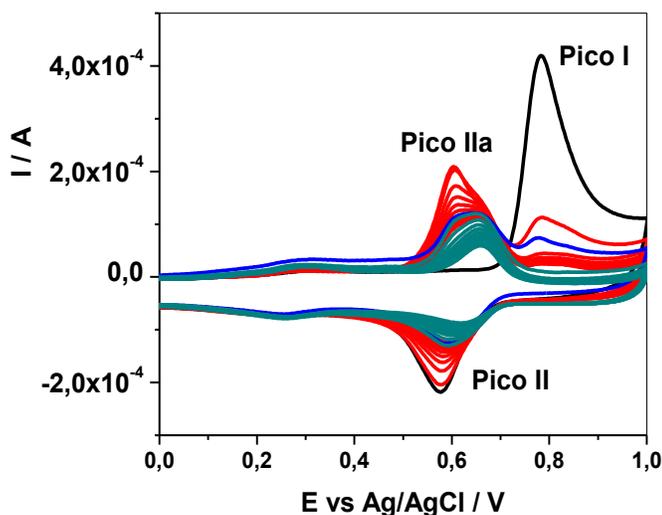


Figura 4.23. Voltamperogramas cíclicos: (—) Primer barrido cíclico de potencial, (—) diez barridos cíclicos consecutivos. $c_{VAl}^* = 1 \times 10^{-3} M$ en $1 M HClO_4$. (—) Primer barrido cíclico y (—) diez barridos cíclicos consecutivos, registrados con posterioridad en una celda conteniendo sólo $1 M HClO_4$ únicamente. $\nu = 0,1 V s^{-1}$.

4.1.4. Comparación de las respuestas electroquímicas de eugenol, isoeugenol y vainillina sobre los diferentes electrodos

En esta sección se muestra cómo es la descarga electroquímica de los tres antioxidantes fenólicos, sobre los diferentes tipos de electrodos estudiados durante el desarrollo de esta tesis doctoral, en el mismo medio de reacción ($1 M HClO_4$), donde la respuesta electroquímica de los tres analitos ha mostrado la mejor definición.

4.1.4.1. Electrodos de carbono vítreo

En la Figura 4.24 se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados, individualmente, para cada uno de los antioxidantes en una celda electroquímica en presencia de los mismos y después de un $t_{ac} = 30 \text{ min}$ a PCA, siendo la concentración de cada uno de ellos $1 \times 10^{-3} M$.

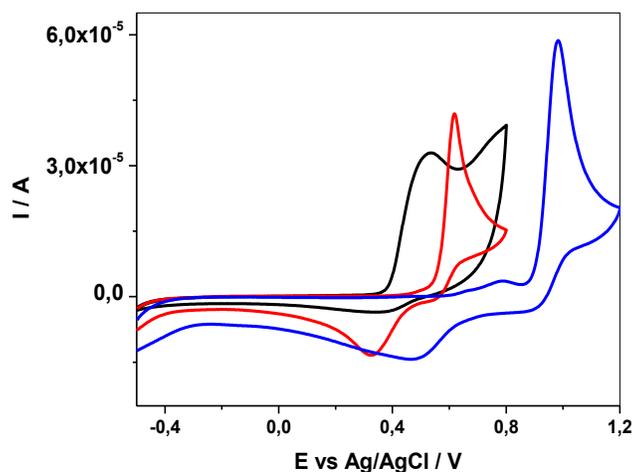


Figura 4.24. Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV en 1 M HClO₄. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3}$ M. $v = 0,1$ V s⁻¹.

4.1.4.2. Electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno

En la Figura 4.25 se muestran los resultados obtenidos cuando los antioxidantes se estudiaron, bajo las mismas condiciones mencionadas para el ECV, sobre el ECV/OG.

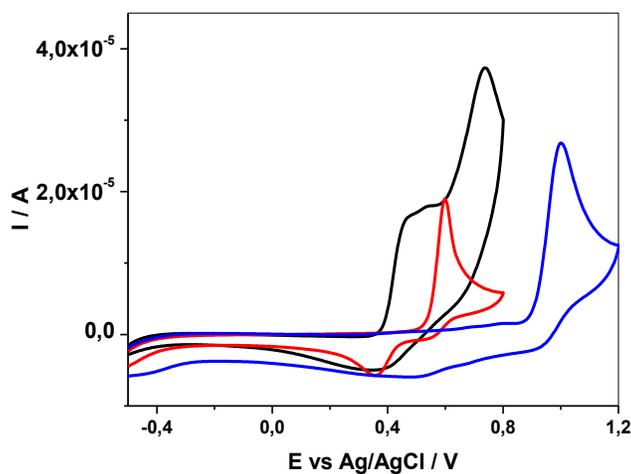


Figura 4.25. Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV/OG en 1 M HClO₄. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $c_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3}$ M. $v = 0,1$ V s⁻¹.

4.1.4.3. Electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

En la Figura 4.26 se muestran los resultados obtenidos para los tres antioxidantes sobre el ECV/OGPRE.

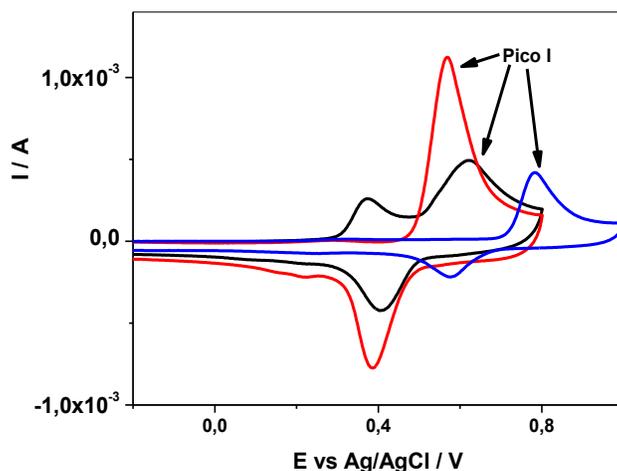


Figura 4.26. Voltamperogramas cíclicos registrados para (—) EUG, (—) IEUG y (—) VAI sobre el ECV/OGPRE en 1 M HClO₄. $t_{ac} = 30$ min a PCA. $C_{ANTIOXIDANTE}^* = 1 \times 10^{-3}$ M. $v = 0,1$ V s⁻¹.

Sobre la base de los resultados obtenidos en las secciones 4.1.4.1, 4.1.4.2 y 4.1.4.3, es posible inferir que tanto EUG como VAI presentan un pico de oxidación principal y un pico de reducción durante el primer barrido de potencial. Por otro lado, IEUG presenta dos picos de oxidación sobre el ECV/OGPRE y un solo pico de reducción, durante el primer barrido de potencial.

Por otra parte, si se compara el pico I, se puede observar que EUG se oxida a potenciales menos anódicos respecto a IEUG. Mientras tanto, de los tres antioxidantes, VAI es la que presenta el pico I a potenciales más anódicos. Este comportamiento puede ser explicado considerando que VAI posee en su estructura molecular un grupo atractor de electrones (Fig. 1.6), que desestabilizaría el correspondiente catión radical formado en la primer etapa del proceso de oxidación.

En la sección 4.1.5 se mostrarán los resultados obtenidos en cuanto a la elucidación del mecanismo de reacción electroquímica de los antioxidantes estudiados.

4.1.5. Elucidación de los mecanismos de reacción electroquímica

4.1.5.1. Estudios con respecto al pico de oxidación principal

En base a lo propuesto por Lin y col. (2014), en la Figura 4.27 se presenta el mecanismo de reacción electroquímica considerado, de manera preliminar, para los antioxidantes. En el primer barrido cíclico, el antioxidante se electro-oxida a través de un mecanismo de $2e^-/2H^+$, generando la 4-R-1,2-diquinona correspondiente (Pico I). Este producto de oxidación se reduce a 4-R-catecol (Pico IIc), el que de manera cuasi reversible se oxida durante el segundo barrido anódico para obtener nuevamente la correspondiente quinona (Pico IIa).

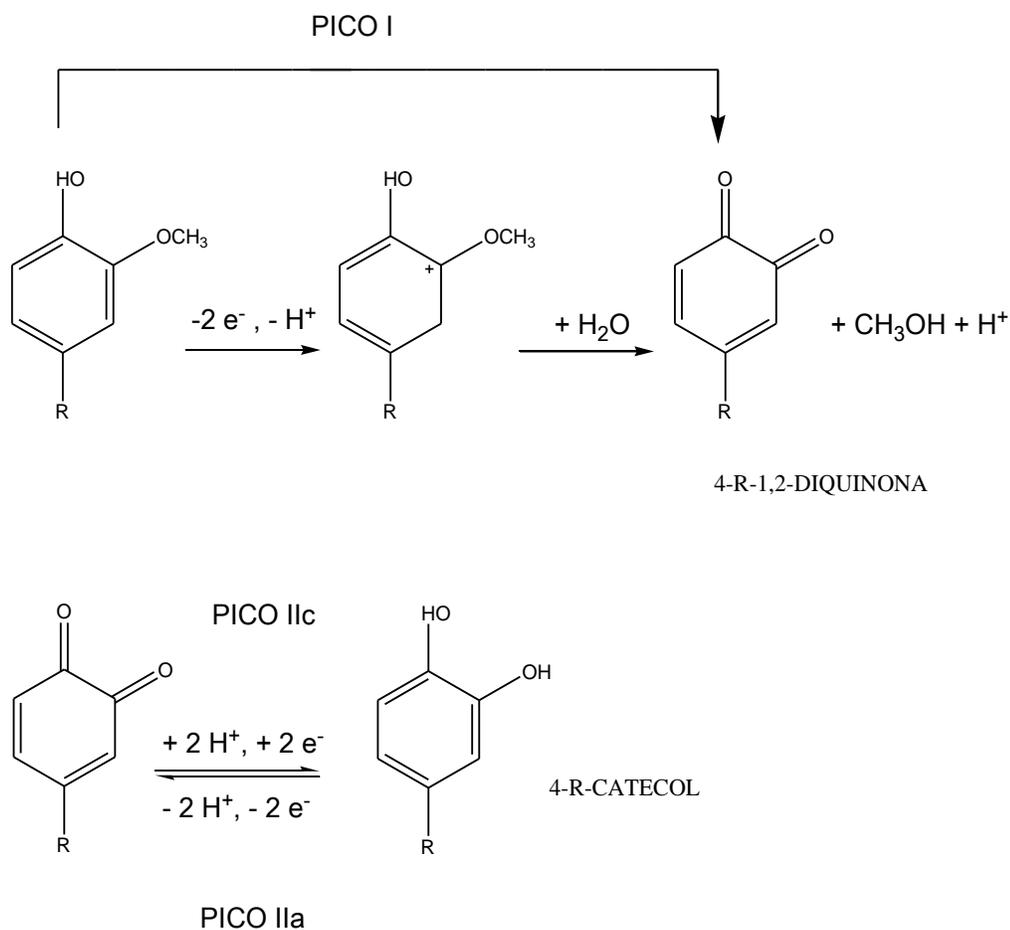


Figura 4.27. Mecanismo de reacción electroquímica considerado para los antioxidantes.

Para comprender mejor el mecanismo en cuestión, se llevó a cabo un estudio computacional para cada uno de los antioxidantes, tal como se mencionó en la sección 3.3.6.

Para EUG

En el esquema de la Figura 4.28 se presenta el mecanismo considerado para EUG (en base a lo propuesto por Yildiz y col., 2017), para realizar los cálculos computacionales.

Los estudios comenzaron considerando la remoción simultánea de un H^+ y de un e^- de la molécula de EUG, originándose dos posibles mecanismos “A” y “B”.

Por medio del mecanismo “A”, se produce la ruptura homolítica del hidrógeno del grupo $-OH$, permitiendo la formación del radical fenoxi (R1) que posee una energía libre de Gibbs relativa a la molécula original (ΔG_{rel}^o) de $12,3 \text{ kcal mol}^{-1}$. El segundo e^- que se sustrae permite la formación de un carbocatión (C1). Después de la reacción con agua, C1 libera un H^+ y una molécula de metanol para generar el producto P1 (4-allil-1,2-diquinona) que posee un ΔG_{rel}^o de 24 eV . Por otra parte, la pérdida de un H^+ y de un e^- por parte de R1 permite la formación de la metilenquinona correspondiente (P2), que posee un ΔG_{rel}^o de 25 kcal mol^{-1} .

Por medio del mecanismo “B”, si se remueve el hidrógeno bencílico del EUG, se forma un radical R2. En el último paso, a partir de R2 y mediante la remoción de un H^+ y de un e^- , se genera nuevamente P2.

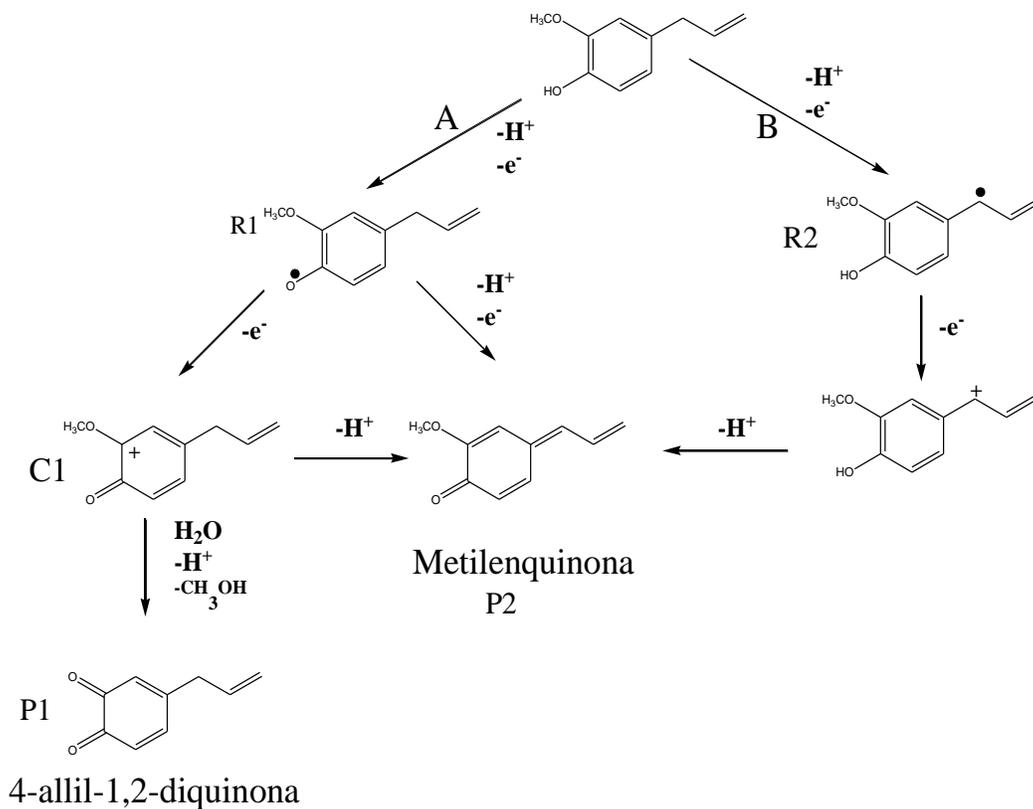


Figura 4.28. Mecanismo de reacción considerado para EUG, a partir de lo propuesto por Yildiz y col., 2017.

Para IEUG

Los estudios se realizaron de manera similar que para EUG, pero en este caso el hidrógeno que se remueve por medio del mecanismo B es alílico. P1 (4-propenil-1,2-diquinona) posee un ΔG_{rel}^o de $33,22 \text{ kcal mol}^{-1}$ mientras que P2 (la metilenquinona correspondiente) posee un ΔG_{rel}^o de $42,68 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Para VAI

Los estudios se realizaron de la misma manera que para EUG e IEUG, sólo que para este caso, es posible plantear únicamente el mecanismo “A” debido a que VAI no posee en su estructura molecular un hidrógeno bencílico ni uno alílico.

El producto P1 (la 4-al-1,2-diquinona) posee un ΔG_{rel}^o de $40,67 \text{ kcal mol}^{-1}$. Mientras que la formación de P2 no es posible

En la Tabla 4.1 se resumen los valores obtenidos para las ΔG_{rel}^o de los diferentes productos posibles generados para EUG, IEUG y VAI, durante el primer barrido anódico de potencial.

Tabla 4.1. Resumen de los valores obtenidos para ΔG_{rel}^o para los diferentes productos posibles generados para EUG, IEUG y VAI, durante el primer barrido anódico de potencial.

Antioxidante	ΔG_{rel}^o de la 4-R-1,2-diquinona (P1) / kcal mol ⁻¹	ΔG_{rel}^o de la metilen quinona (P2) / kcal mol ⁻¹
EUG	24	25
IEUG	33,22	42,68
VAI	40,67	-

En el caso de EUG no existe, prácticamente, diferencia entre los valores obtenidos para P1 y P2, lo que indicaría que ambos productos pueden formarse. Para IEUG, hay una diferencia de 9,46 kcal mol⁻¹, indicando que la 4-propenil-1,2-diquinona sería más factible de ser formada, al igual que para la VAI donde la probabilidad de formar la metilen quinona (P2) no es factible. De todas formas, el par redox IIa/IIc resultaría de la oxidación/reducción de la correspondiente diquinona.

4.1.5.2. Estudios con respecto al par redox IIa/IIc

Caracterización de los productos de oxidación de los tres antioxidantes

Se encontró que tanto EUG, IEUG como VAI generan, como producto de la oxidación electroquímica, un par redox quasi-reversible (IIa/IIc) después de varios barridos cíclicos consecutivos. Dicho par se denominará “producto de oxidación” (PO). En la Figura 4.29 se muestran los PO obtenidos para EUG, IEUG y VAI sobre el ECV/OGPRE en 1 M HClO₄.

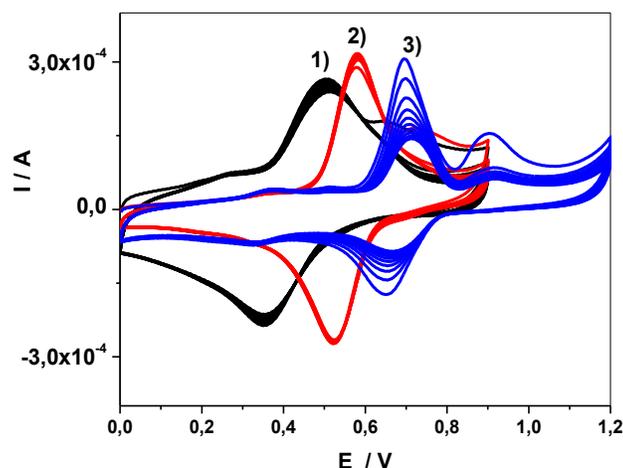


Figura 4.29. Voltamperogramas cíclicos registrados sobre ECV/OGPRE en 1 M HClO₄ para: PO's de 1) EUG, 2) IEUG y 3) VAI. $c_{\text{ANTIOXIDANTE}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Se observa que las posiciones de los pares redox sobre el eje de potencial sigue el mismo orden que aquel que los picos de oxidaciones de los tres antioxidantes, siendo probablemente responsables de esto los distintos sustituyentes en las estructuras moleculares.

Una vez generados los PO's de los tres antioxidantes, el ET se enjuagó con solución de blanco y se transfirió a una celda en presencia del mismo (1 M HClO₄). En la Figura 4.30a se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el PO de EUG a distintas velocidades de barrido, mientras que en la Figura 4.30b se muestra la dependencia de los $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ con el log v.

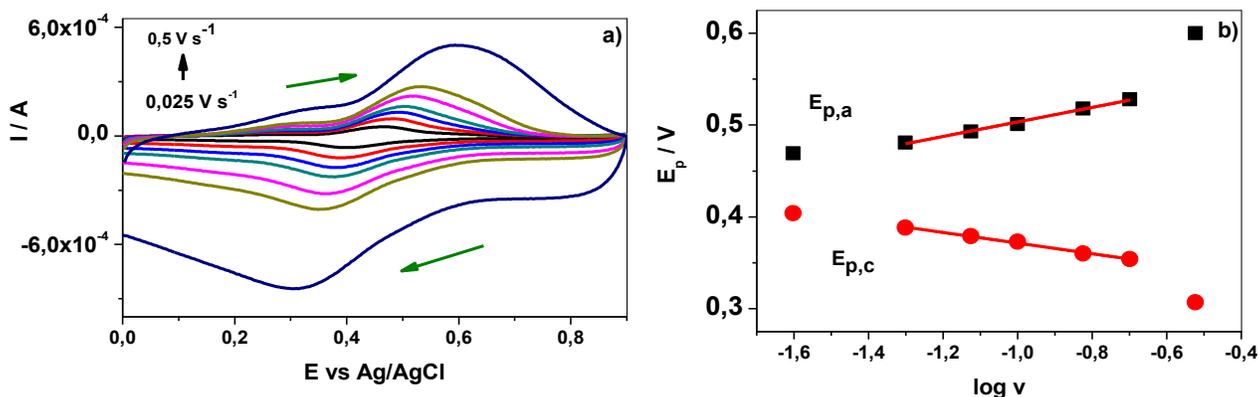


Figura 4.30. a) Voltamperogramas cíclicos registrados para el PO de EUG en 1 M $HClO_4$ a diferentes velocidades de barrido. b) Gráfico de $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ en función del $\log v$.

Siguiendo una metodología propuesta por Laviron (1979) para sistemas superficiales quasireversibles, donde ambos componentes del par redox están fuertemente adsorbidos sobre la superficie del electrodo, fue posible determinar los parámetros cinéticos, tales como la constante de velocidad heterogénea global (k_s) y el coeficiente de transferencia de carga anódico ($1 - \alpha$). Así, de un gráfico de E_p vs $\log v$ (Figura 4.30b) es posible calcular el valor de $(1-\alpha)$, considerando que, en dicho gráfico, la pendiente de la porción lineal que corresponde a $E_{p,a}$ es igual a:

$$2,303 \times R \times T / (1 - \alpha) \times n \times F \quad (4.1)$$

donde $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 295 \text{ K}$, $F = 96484,6 \text{ C}$ y $n = 2$.

Mientras que k_s se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \left(\frac{RT}{Fnv} \right) - \frac{\alpha n F \Delta E_p (1 - \alpha)}{2,3 RT} \quad (4.2)$$

Se trabajó en un intervalo de v comprendido entre $0,025$ y $0,5 \text{ V s}^{-1}$. En cada caso se utilizaron sólo aquellos datos en los que se cumple que $\Delta E_p > 0,1 \text{ V}$.

Resultados similares a los mostrados para EUG se obtuvieron para IEUG y VAI. En la Tabla 4.2 se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para cada uno de los antioxidantes.

Tabla 4.2. Valores de los parámetros cinéticos para los PO's de EUG, IEUG y VAI.

PO	k_s / s^{-1}	$(1 - \alpha)$
EUG	2,62	0,41
IEUG	3,7	0,46
VAI	4,8	0,32

4.1.6. Isoterma de adsorción para eugenol sobre electrodo de carbono vítreo modificado con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

4.1.6.1. Determinación del mejor potencial de acumulación

Se determinó para EUG un control predominantemente adsorptivo para el proceso de oxidación sobre el electrodo ECV/OGPRE en 1 M HClO₄. Así, se eligió este medio de reacción para encontrar el mejor E_{ac} y luego estudiar cuál sería el t_{ac} óptimo para, finalmente, encontrar la isoterma de adsorción que mejor describa la interacción específica de EUG con el ECV/OGPRE.

Para seleccionar el mejor E_{ac} se estudiaron las respuestas voltamperométricas registradas a: PCA (la lectura fue de 0,215 V vs Ag/AgCl) y a los valores entre 0 y 0,4 V vs Ag/AgCl. Cada experiencia que se realizó a un E_{ac} significó un nuevo electrodo ECV/OGPRE. Todos los voltamperogramas cíclicos fueron registrados en un intervalo de 0 a 0,9 V a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, después de 30 minutos de acumulación, con agitación magnética bajo el correspondiente E_{ac} , en una solución de EUG ($c_{EUG}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) y después de 20 segundos para permitir la estabilización del sistema.

En la Figura 4.31 se muestra la variación de $I_{p,a}$ (Pico I) con el E_{ac} . Cada E_{ac} se midió por triplicado durante tres días diferentes. La mejor respuesta se obtuvo para PCA (0,215 V vs Ag/AgCl).

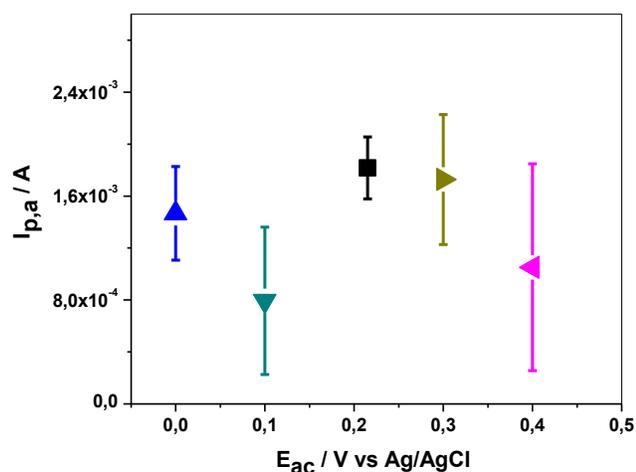


Figura 4.31. Dependencia de las $I_{p,a}$ (Pico I) con el E_{ac} : ■ (PCA) ▲ (0 V vs Ag/AgCl) ▼ (0,1 V vs Ag/AgCl) ► (0,3 V vs Ag/AgCl) ◄ (0,4 V vs Ag/AgCl) (las barras indican las correspondientes desviaciones estándares para $n = 3$).

4.1.6.2. Determinación del mejor tiempo de acumulación.

Los próximos estudios se dirigieron a determinar las dependencias de las $I_{p,a}$ (Pico I) con el t_{ac} para diferentes c_{EUG}^* .

Para cada c_{EUG}^* , se trabajó con los siguientes t_{ac} : 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutos. Cada t_{ac} significó el uso de un electrodo ECV/OGPRE nuevo.

Se trabajó con las siguientes c_{EUG}^* : 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} y 1×10^{-2} M a una temperatura de 22 °C. En las Figuras 4.32 y 4.33 se muestran las dependencias de las $I_{p,a}$ y de Q del pico I con el t_{ac} , respectivamente, para diferentes c_{EUG}^* .

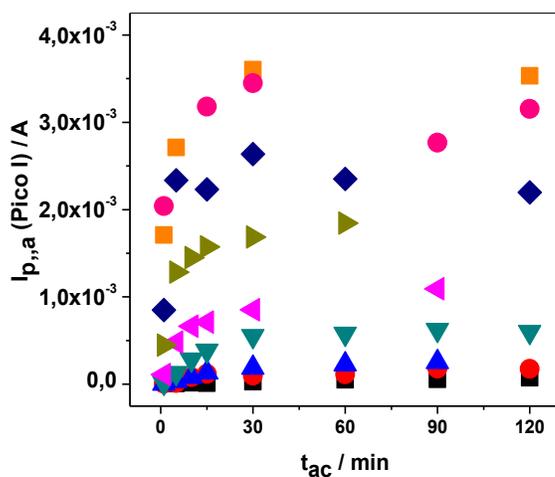


Figura 4.32. Dependencia de las $I_{p,a}$ (Pico I) con el t_{ac} para diferentes c_{EUG}^* : ■ ($1 \times 10^{-6} M$) ● ($5 \times 10^{-6} M$) ▲ ($1 \times 10^{-5} M$) ▼ ($5 \times 10^{-5} M$) ◀ ($1 \times 10^{-4} M$) ▶ ($5 \times 10^{-4} M$) ◆ ($1 \times 10^{-3} M$) ■ ($5 \times 10^{-3} M$) ● ($1 \times 10^{-2} M$).

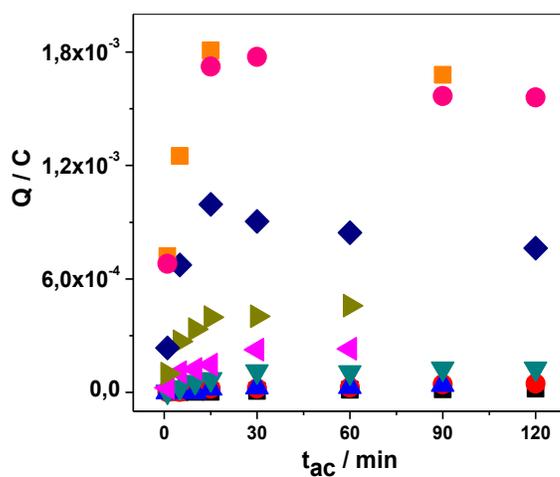


Figura 4.33. Dependencia de las Q (Pico I) con el t_{ac} para diferentes c_{EUG}^* : ■ ($1 \times 10^{-6} M$) ● ($5 \times 10^{-6} M$) ▲ ($1 \times 10^{-5} M$) ▼ ($5 \times 10^{-5} M$) ◀ ($1 \times 10^{-4} M$) ▶ ($5 \times 10^{-4} M$) ◆ ($1 \times 10^{-3} M$) ■ ($5 \times 10^{-3} M$) ● ($1 \times 10^{-2} M$).

4.1.6.3. Estudio de la dependencia de la corriente de pico anódica (Pico I) con el tiempo de acumulación para diferentes temperaturas

En la Figura 4.36 se muestra la variación de $I_{p,a}$ (Pico I) con el t_{ac} para distintas temperaturas. Los valores de las $I_{p,a}$ (pico I) se incrementaron con el aumento de la temperatura, lo que indicaría que la entalpía de adsorción de EUG sobre los ECV/OGPRE tendría un valor positivo.

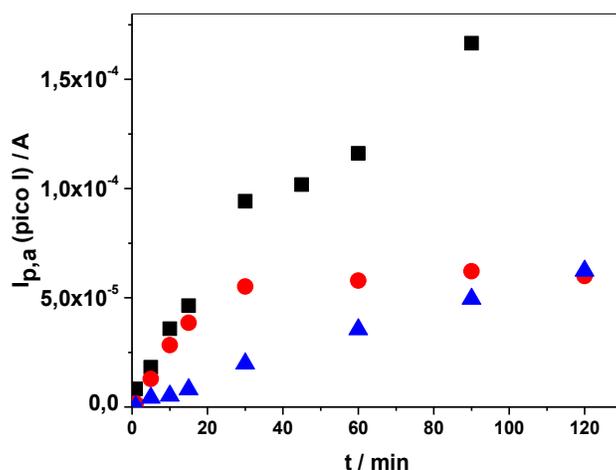


Figura 4.36. Dependencia de $I_{p,a}$ (pico I) con t_{ac} para distintas temperaturas: \blacktriangle (0 °C) \bullet (22 °C) \blacksquare (35 °C). $c_{EUG}^* = 5 \times 10^{-5} M$.

4.1.6.4 Derivación de las isothermas de adsorción

Se determinó la dependencia de c_{EUG}^* con Θ , el cual se define como:

$$\Theta = \frac{Q}{Q_{m\acute{a}x}} \quad (4.3)$$

donde Q es la carga determinada a partir de los voltamperogramas cíclicos registrados a diferentes c_{EUG}^* a un t_{ac} de 30 minutos y $Q_{m\acute{a}x}$ es el valor máximo de Q obtenido, para el mismo t_{ac} , a $c_{EUG}^* = 5 \times 10^{-3} M$.

La isoterma que mejor describe la interacción específica de EUG con los electrodos ECV/OGPRE es la isoterma de Freundlich (Freundlich, 1926). La ecuación de Freundlich, empírica (Adamson, 1990), puede ser expresada como:

$$\Theta = \beta c^n \quad (4.4)$$

Donde β es una constante específica para un proceso superficial a una dada temperatura y es una medida de la capacidad y el promedio de afinidad, mientras que n es el índice de heterogeneidad (Appell, 2007).

En la Figura 4.37 se muestra un gráfico de c_{EUG}^* vs Θ . Los puntos representan las medidas experimentales y en línea sólida se muestra el mejor ajuste de dichos datos, empleando la ecuación 4.4.

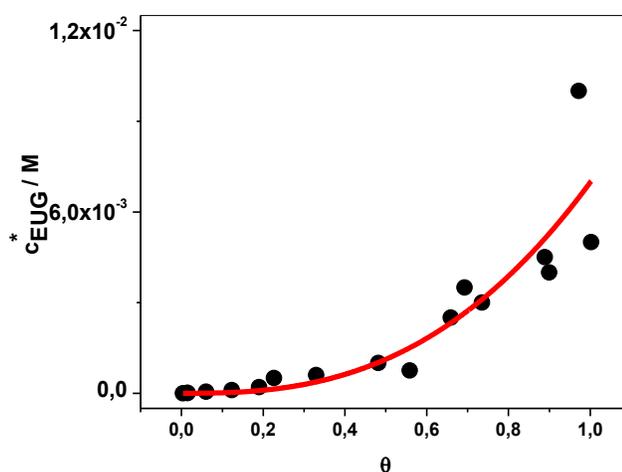


Figura 4.37. Dependencia de c_{EUG}^* con Θ . (●) Datos obtenidos experimentalmente. (—) Mejor ajuste obtenido utilizando la ecuación de Freundlich. $t_{ac} = 30$ min.

La forma linearizada de la ecuación 4.4 es:

$$\ln \Theta = \ln \beta - n \ln c \quad (4.5)$$

Así, a partir de un gráfico de $\ln \theta$ vs $\ln c$ (ec. 4.5) es posible calcular los valores de n y β de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente. En la Figura 4.38 se muestra un gráfico de la ecuación linearizada de Freundlich.

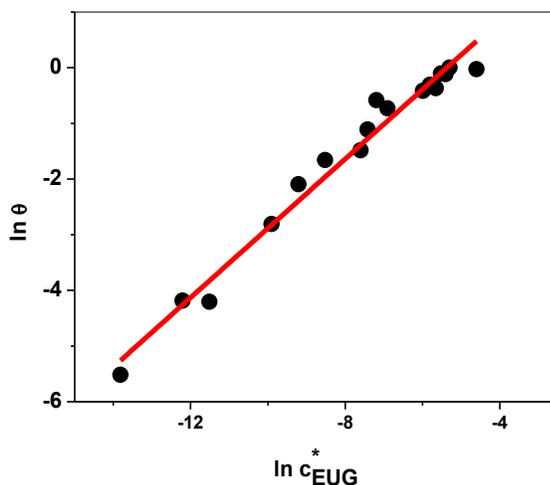


Figura 4.38. Gráfico de la ecuación linearizada de Freundlich: $\ln \theta$ vs $\ln c$. (●) Datos experimentales. (-) Mejor ajuste obtenido.

A partir de la ecuación linearizada de Freundlich se obtuvieron los siguientes valores para los parámetros anteriormente mencionados:

$$n = 0,51 \pm 0,05$$

$$\beta = 14 \pm 4$$

Estos valores se encuentran en concordancia con otros valores obtenidos de la literatura para moléculas orgánicas. Así, para la micotoxina altertoxina I (ATX-I) sobre electrodos de pasta de carbono se obtuvo un valor de $\beta = 8,58$ y para $n = 0,74$ (Molina y col., 2000). Para la micotoxina cercosporina β fue igual a 5,79 y $n = 0,50$ sobre ECV (Marchiando y col., 2003). Para el ácido cafeico, sobre la misma superficie que para EUG (ECV/OGPRE), se obtuvieron valores de, aproximadamente, un orden de magnitud mayor (Robledo y col., 2016).

4.2. Propiedades de los diferentes electrodos de trabajo utilizados

4.2.1. Electrodos de carbono vítreo modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente

En la Figura 4.39 se muestran los voltamperogramas cíclicos referidos a la reducción electroquímica de OG a OGPRE (sección 3.3.3.1). Es posible apreciar en el primer barrido de potencial la aparición de dos picos de reducción situados en $-0,65$ V y en $-1,5$ V vs Ag/AgCl, lo que indica la reducción de algunos de los grupos oxigenados del OG. En los barridos sucesivos, comienza a disminuir la intensidad de la corriente, lo que puede asociarse con la remoción de los mencionados grupos disponibles en la superficie de las láminas de OG.

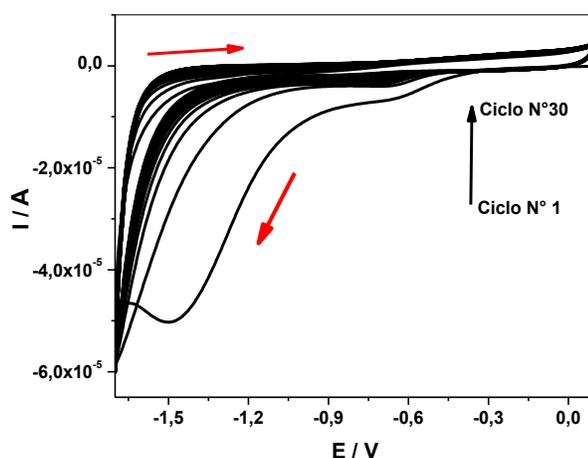


Figura 4.39. Voltamperogramas cíclicos registrados durante la reducción de OG a OGPRE en $0,2$ M SRF pH 7,00. $v = 0,052$ V s^{-1} .

4.2.2. Caracterización de los electrodos modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente mediante microscopía de fuerza atómica

Las Figuras 4.40 y 4.41 muestran las topografías AFM tridimensionales del OG y del OGPRE, respectivamente (Robledo y col., 2016). El OG original muestra una superficie ondulada uniforme, lo que puede deberse al apilado y doblado de las láminas de

manera desordenada, produciendo una aglomeración que, después del secado, se ve como una superficie ondulada lisa. Después del proceso de reducción electroquímica, la superficie se vuelve más arrugada pero un tanto más suave en los valles ubicados entre las arrugas. La rugosidad de la superficie (R_a) del OG y del OGPRE, para un área seleccionada de $2 \times 2 \mu\text{m}$ es, aproximadamente de 15 y 10 nm, respectivamente.

Los métodos de reducción electroquímica eliminan los grupos funcionales oxigenados, incrementando la grafitización, la hidrofobicidad y las interacciones intercapa. Las ondas originales del OG se observan como arrugas afiladas en el OGPRE. Dichas ondas pueden ser asociadas a las fuerzas atractivas de Van der Waals y a las interacciones hidrofóbicas entre los dominios gráficos en el plano basal de las láminas del OGPRE.

Además, en el OGPRE se observan pequeñas partículas distribuidas al azar, que pueden ser cristales de electrolito atrapados entre las láminas, que no han podido ser lavadas después de la reducción (Robledo y col., 2016).

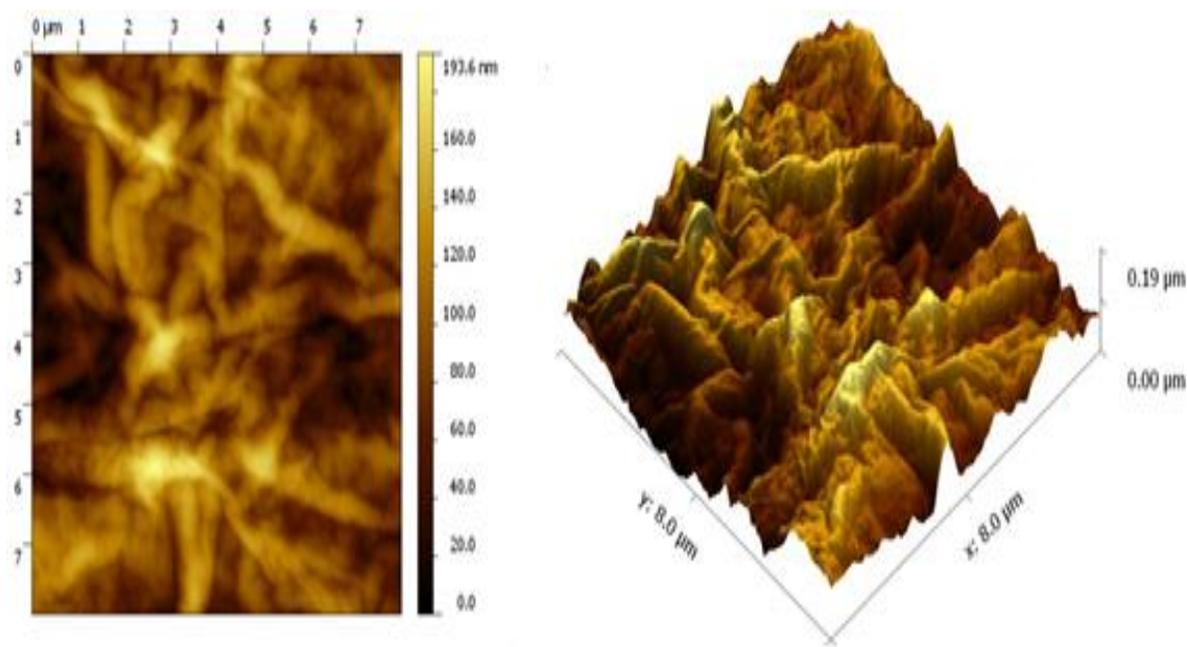


Figura 4.40. *Imágenes AFM obtenidas para el OG.*

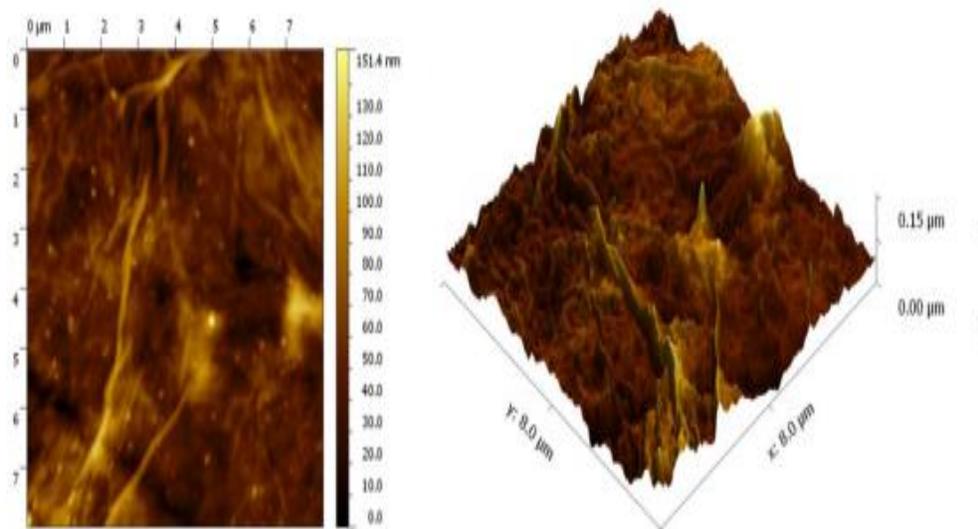


Figura 4.41. Imágenes AFM obtenidas para el OGPRES.

4.2.3. Caracterización de los electrodos modificados con óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente mediante espectroscopía de impedancia electroquímica

Las Figuras 4.42, 4.43 y 4.44 muestran los gráficos de Nyquist obtenidos para el ECV, el ECV/OG y el ECV/OGPRE, respectivamente.

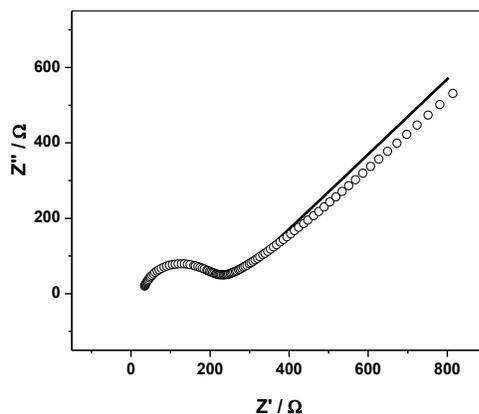


Figura 4.42. Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV en $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ + $0,1 \text{ M KCl}$. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado.

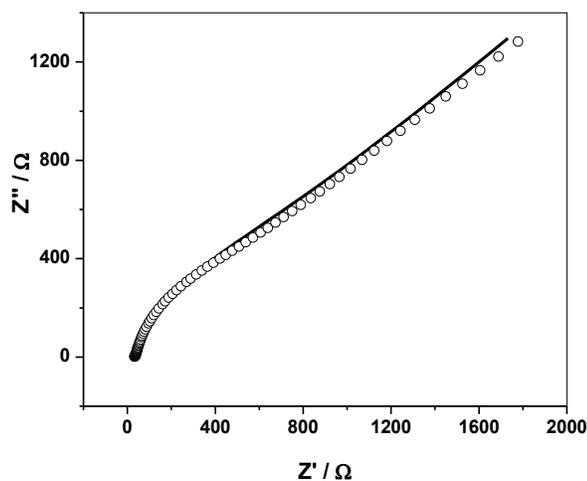


Figura 4.43. Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV/OG en $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3} + 0,1 \text{ M KCl}$. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado.

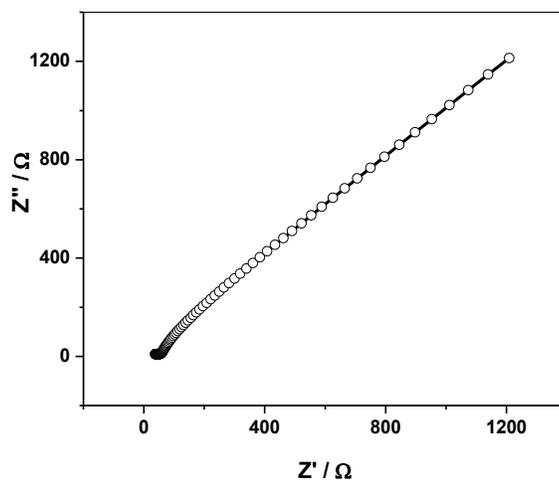


Figura 4.44. Gráfico de Nyquist obtenido para el ECV/OGPRE en $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3} + 0,1 \text{ M KCl}$. La línea sólida corresponde al espectro de impedancia simulado.

En la Figura 4.45 se muestran los circuitos eléctricos equivalentes que ajustaron los gráficos de impedancia.

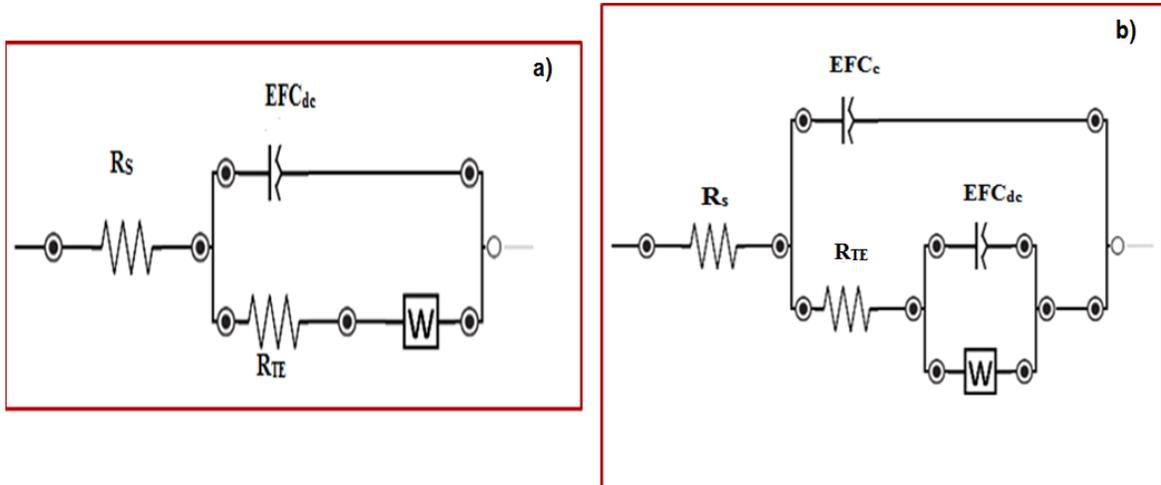


Figura 4.45. Circuitos equivalentes que mejor ajustaron a) Circuito de Randless y b) Circuito utilizado por Casero y col. 2012.

En la Figura 4.45b, EFC_c es el elemento de fase constante de un recubrimiento aislante que dificulta la transferencia electrónica. Los demás elementos que componen los circuitos fueron descritos en la sección 2.1.6.

En la Tabla 4.3 se muestran, para los diferentes electrodos utilizados, cuál fue el mejor circuito eléctrico que ajustó el espectro experimental, así como también los valores obtenidos para R_{TE} .

Tabla 4.3. Mejor circuito y R_{TE} para los diferentes electrodos utilizados.

Electrodo	Mejor circuito	R_{TE} / Ω
ECV	Randless	196
ECV/OG	Casero y col., (2012)	520
ECV/OGPRE	Casero y col., (2012)	50

4.2.4. Comparación de la respuesta electroquímica de cada uno de los antioxidantes sobre los diferentes electrodos.

En las Figuras 4.46, 4.47 y 4.48 se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados para EUG, IEUG y VAI, respectivamente sobre ECV, ECV/OG y ECV/OGPRE. Para los tres antioxidantes se presentan resultados análogos. Existe un marcado incremento en $I_{p,a}$ cuando la descarga electroquímica ocurre sobre el ECV/OGPRE, lo que pone de manifiesto un aumento en la sensibilidad debido a la recuperación de la conductividad eléctrica del material tras la reducción del OG. Asimismo, se observa un corrimiento hacia potenciales menos anódicos para $E_{p,a}$ sobre el ECV/OGPRE.

Por otra parte, es posible observar cómo, en el caso del ECV/OG, ocurre una disminución de $I_{p,a}$. El OG es considerado una película aislante, que bloquea la transferencia electrónica en la interfaz electrodo-solución. Este comportamiento se explica por los grupos funcionales oxigenados, que determinan la pérdida de movilidad de los electrones de conducción.

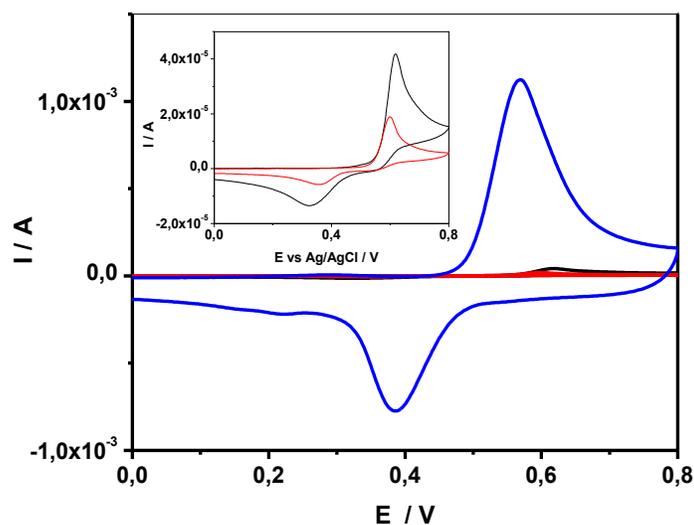


Figura 4.46. Voltamperogramas cíclicos de EUG registrados sobre (—) ECV, (—) ECV/OG (—) y ECV/OGPRE, en 1 M HClO₄. $c_{EUG}^* = 1 \times 10^{-3} M$, $v = 0,1 V s^{-1}$. $t_{ac} = 30 min$, $E_{ac} = PCA$.

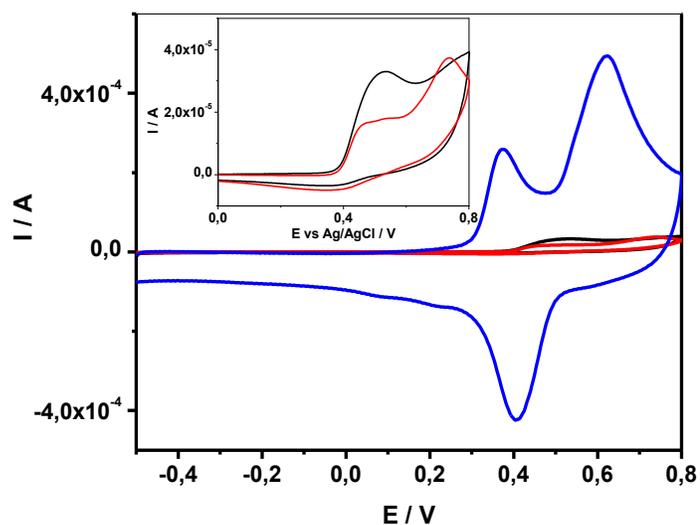


Figura 4.47. Voltamperogramas cíclicos de IEUG registrados sobre (—) ECV (—) ECV/OG (—) ECV/OGPRE, en 1 M HClO_4 . $c_{\text{IEUG}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{\text{ac}} = 30 \text{ min}$, $E_{\text{ax}} = \text{PCA}$.

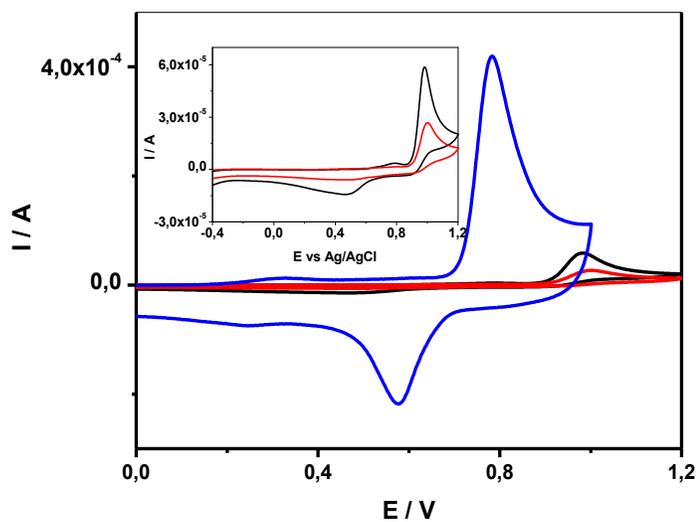


Figura 4.48. Voltamperogramas cíclicos de VAI registrados sobre (—) ECV (—) ECV/OG (—) ECV/OGPRE, en 1 M HClO_4 . $c_{\text{VAI}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $t_{\text{ac}} = 30 \text{ min}$, $E_{\text{ax}} = \text{PCA}$.

En la Tabla 4.4 se muestran los valores de densidad de corriente (J) y de área electroquímica (A_e) calculados para el ECV y el ECV/OGPRE (Robledo y col., 2016).

Tabla 4.4. Valores de J y A_e calculados para el ECV y el ECV/OGPRE.

Electrodo	J / A cm⁻²	A_e / cm²
ECV	1,900 x 10 ⁻⁵	0,098 ± 0,004
ECV/OGPRE	2,955 x 10 ⁻⁵	1,4

Los valores presentados en la Tabla 4.4 muestran que, al no ser significativas las diferencias en los valores de J y A_e entre el ECV y el ECV/OGPRE, existe un fenómeno de electrocatálisis por parte del OGPRES que genera el corrimiento en el $E_{p,a}$ anteriormente descrito.

4.3. Determinación de las constantes de acidez aparentes de cada uno de los antioxidantes y cinética enzimática

4.3.1. Determinación de las constantes de acidez aparente de los tres antioxidantes

Las Figuras 4.49, 4.50 y 4.51 muestran los espectros de absorción UV-Visible para EUG, IEUG y VAI, respectivamente, para una dada $c_{ANTIOXIDANTE}^*$ en diferentes medios de reacción. EUG (Figura 4.49) muestra un máximo de absorción a $\lambda = 280$ nm en el intervalo de 1M HClO₄ a pH 10,00. El máximo de absorción se mueve a $\lambda = 290$ nm a pH 11,00 y a $\lambda = 295$ nm a pH 12,00. IEUG (Figura 4.50) muestra un máximo de absorción a $\lambda = 258$ nm en el intervalo de 1M HClO₄ a pH 8,00. El máximo de absorción se mueve a $\lambda = 280$ nm a pH's entre 10,40 y 12,40. VAI (Figura 4.51) muestra un máximo de absorción a $\lambda = 279$ nm y a $\lambda = 309$ nm en el intervalo de 1M HClO₄ a pH 6,00. La diferencia en el comportamiento de VAI con respecto a EUG e IEUG puede ser explicada considerando que VAI presenta un grupo aldehído en su estructura. Luego, las bandas de absorción pueden ser asignadas a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente (Morrison y Boyd, 1998). A pH 7,00 las bandas a $\lambda = 279$ y a $\lambda = 309$ nm para VAI comienzan a decrecer y se define un hombro alrededor de $\lambda = 350$ nm. A pH 8,00 se define una pequeña banda de absorción a $\lambda = 279$ nm y un máximo a $\lambda = 346$ nm. En el intervalo de pH entre 10,00 y 12,00 se define una pequeña banda de absorción a $\lambda = 294$ nm y un máximo a $\lambda = 346$ nm.

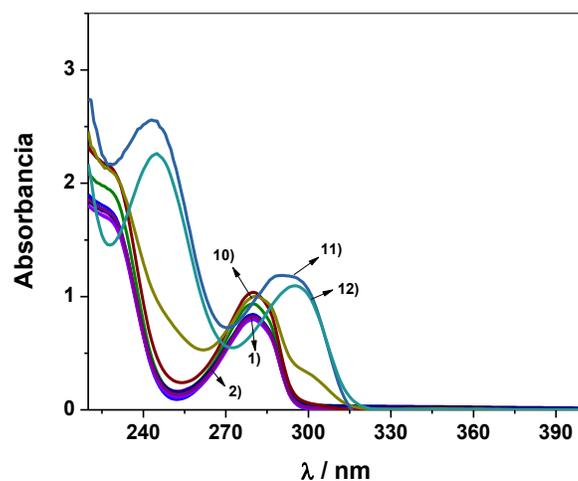


Figura 4.49. Espectros de absorción UV-Visible para EUG en diferentes medios de reacción: 1) 1 M HClO_4 , de 2) a 10), 0,2 M SRF pH 2,00; 3,10; 4,20; 5,20; 6,10; 7,00; 8,00; 9,30; 10,00, respectivamente. Espectros 11) y 12) pH = 11,00 y 11,90, respectivamente. $c_{\text{EUG}}^* = 3 \times 10^{-4}$ M. Celda de cuarzo, camino óptico (b) = 1 cm.

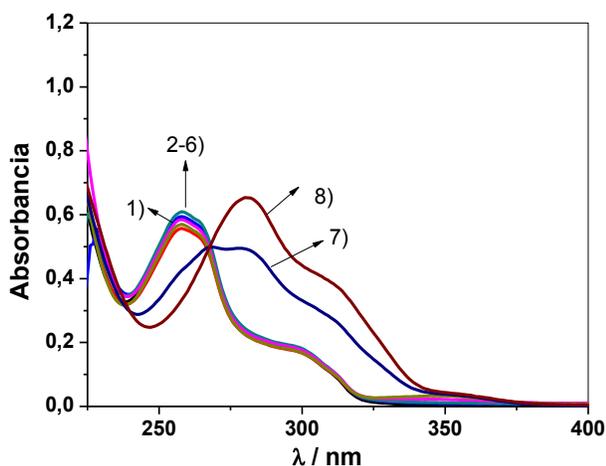


Figura 4.50. Espectros de absorción UV-Visible para IEUG en diferentes medios de reacción. 1) 1 M HClO_4 , de 2) a 6) 0,2 M SRF pH's 2,10; 4,00; 6,00; 7,00; 8,00, respectivamente. Espectros 7) y 8) pH's 10,4 y 12,0, respectivamente. $c_{\text{IEUG}}^* = 2,5 \times 10^{-5}$ M. Celda de cuarzo, $b = 1$ cm.

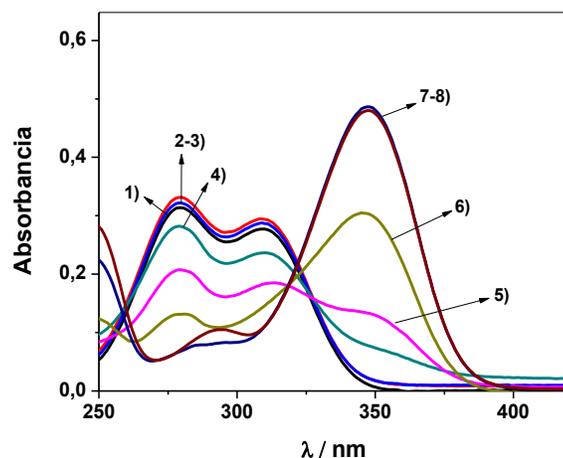


Figura 4.51. Espectros de absorción UV-Visible de VAI en diferentes medios de reacción. 1) 1 M HClO₄, de 2) a 4), 0,2 M SRF pH's 2,00; 4,00; 6,00, respectivamente. Espectro 5) 0,2 M SRF, pH 7,00; Espectro 6) 0,2 M SRF, pH 8,00; Espectros 7) y 8), 0,2 M SRF pH's 10,40 y 12,00, respectivamente. $c_{VAI}^* = 5 \times 10^{-5}$ M. Celda de cuarzo, $b = 1$ cm.

Se calcularon los ϵ de los componentes en solución a partir de la ley de Lambert-Beer. Por lo tanto, primero se verificó si tanto EUG como IEUG y VAI satisfacen la mencionada ley. A partir de estos resultados, se obtuvieron los siguientes valores:

$$\epsilon_{EUG}^{280} = (2,64 \pm 0,03) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{EUG}^{290} = (3,57 \pm 0,06) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{IEUG}^{258} = (2,28 \pm 0,03) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{IEUG}^{280} = (2,55 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{VAI}^{279} = (6,0 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{VAI}^{309} = (5,18 \pm 0,07) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{VAI}^{346} = (1,074 \pm 0,004) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

En la Figura 4.52 se muestra, para EUG, el ajuste de los datos experimentales de A vs pH a la λ donde se encuentra el menor error. Para EUG este valor corresponde a $\lambda = 269 \text{ nm}$. En la Figura 4.53 se muestran los resultados análogos obtenidos para IEUG, donde la λ de menor error corresponde a $\lambda = 317 \text{ nm}$, mientras que en la Figura 4.54 se muestran los resultados obtenidos para VAI, donde la λ de menor error es $\lambda = 265 \text{ nm}$.

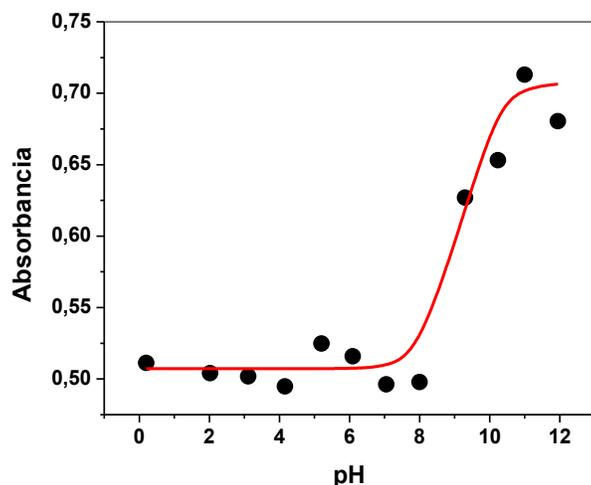


Figura 4.52. Variación de A con el pH a $\lambda = 269 \text{ nm}$ para EUG. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste.

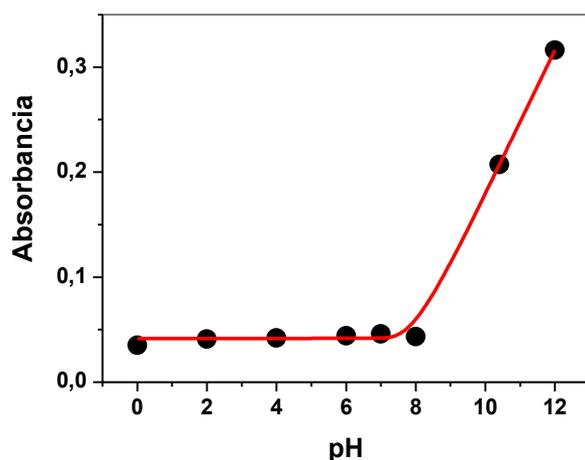


Figura 4.53. Variación de A con el pH a $\lambda = 317 \text{ nm}$ para IEUG. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste.

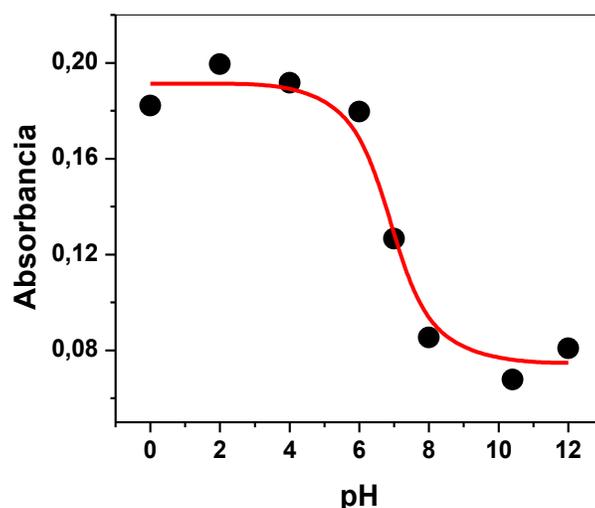


Figura 4.54. Variación de A con el pH a $\lambda = 265 \text{ nm}$ para VAI. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (-) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste.

En la Tabla 4.5 se muestran los valores de las K_a^{AP} obtenidas junto a los valores del error cuadrático medio (ECM) y del error relativo porcentual (ERP %).

Tabla 4.5. K_a^{AP} obtenidas para los antioxidantes a la λ de menor error el ajuste no lineal.

Antioxidante	K_a^{AP}	ECM	ERP %
EUG	$6,3 \times 10^{-11}$	$6,3 \times 10^{-2}$	11,2
IEUG	$5,8 \times 10^{-11}$	$3,0 \times 10^{-3}$	3,0
VAI	$1,2 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-3}$	4,0

De los tres antioxidantes estudiados, VAI es el más ácido. Este comportamiento puede ser explicado considerando que el grupo aldehído, que posee VAI en su estructura molecular, es un sustituyente atractor de electrones, por lo cual el anión RO^- , generado por la pérdida de un H^+ , queda estabilizado por resonancia. El valor de K_a^{AP} para VAI concuerda con aquel obtenido por Kortüm y Andrussov (1961), el cual fue $K_a^{AP} = 4 \times 10^{-8}$.

Por otra parte, los grupos metoxi, alílicos y propenílicos son dadores de electrones por resonancia y por hiperconjugación. Esto permite explicar por qué EUG e IEUG son menos ácidos que el fenol y a la vez poseen valores similares de K_a^{AP} entre ellos (McMurray, 2010).

4.3.2. Determinaciones cinéticas

4.3.2.1. Eugenol

Como se describió anteriormente, EUG presenta un máximo de absorción a $\lambda = 280$ nm. Cuando comienza su reacción con la EPS, aparece una nueva banda de absorción a $\lambda = 358$ nm. Debido a la superposición de ambas bandas, no fue posible estudiar directamente la desaparición del analito en el tiempo. La Figura 4.55 muestra los espectros de absorción UV-Visible registrados a diferentes tiempos para la reacción entre EUG y EPS, bajo ciertas condiciones experimentales (detalladas en el pie de la Figura 4.55)

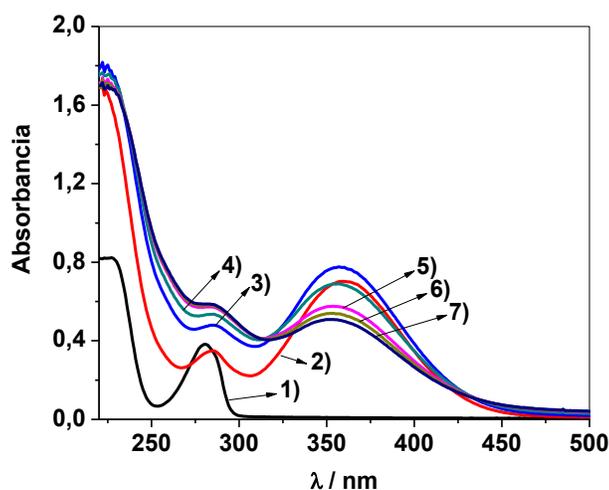


Figura 4.55. Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre EUG y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 6. Tiempos de reacción: de 1) a 7) 0; 11,6; 102,2; 202,2; 412,2; 502,2 y 592,2 s, respectivamente.

$$c_{EUG}^* = 162 \mu M, c_{H_2O_2}^* = 379 \mu M, c_{EPS}^* = 40 nM.$$

La banda con un máximo a $\lambda = 358$ nm ha sido asignada a la formación de una metilen o-quinona inestable, que desaparece a medida que la reacción progresa (Thompson y col., 1989).

La Figura 4.56 muestra los perfiles de concentración de EUG en función del tiempo, obtenidos después de aplicar el algoritmo RMC-MCA a la matriz de datos D para cada una de las cinéticas estudiadas. Este comportamiento demuestra que EUG es co-sustrato de la EPS. v_i fue calculada usando los primeros puntos de los perfiles de concentración vs. tiempo.

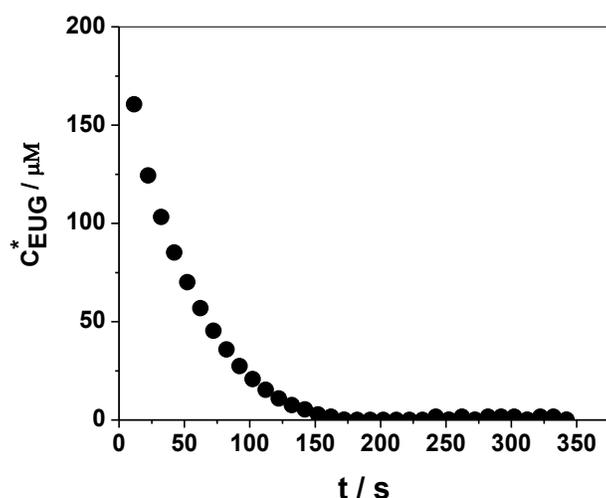


Figura 4.56. Perfiles de c_{EUG}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 6,00. $c_{EUG}^* = 162 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 379 \mu M$, $c_{EPS}^* = 40 nM$.

La Tabla 4.6 muestra el ANOVA obtenido para un modelo de superficie de respuesta lineal. Los valores de “Prob > F” menores o iguales a 0,0500 indican que los términos son significativos. A partir de este análisis, es posible inferir que v_i depende de c_{EUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$, y que el pH y c_{EPS}^* no poseen influencia (ecuación 4.6). La no dependencia de v_i con el pH puede ser explicada considerando que la EPS presenta actividad enzimática en un amplio intervalo de pH (Nissum y Schiodt, 2001). La no dependencia de

v_i con la c_{EPS}^* , dentro de la región experimental estudiada, podría indicar que los experimentos han sido llevados a cabo bajo condición saturación de la enzima.

Tabla 4.6. *Análisis de ANOVA para un modelo de superficie de respuesta lineal obtenido para EUG.*

Factor	Prob > F
A-c_{EUG}^*	< 0.0001
C-$c_{H_2O_2}^*$	0,0552

Ecuación final en término de factores significativos:

$$v_i = - 2,25 c_{EUG}^* + 1,18 c_{H_2O_2}^* \quad (4.6)$$

La Figura 4.57 muestra el gráfico de la superficie de respuesta, donde v_i se presenta como función de los dos factores significativos c_{EUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$. Por otra parte, aunque v_i se incrementa con el incremento de c_{EUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$, no encontrándose un límite superior para la velocidad de reacción, bajo las condiciones estudiadas.

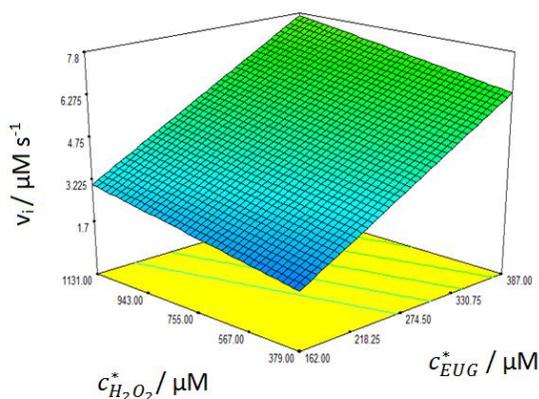


Figura 4.57. *Gráfico de superficie de respuesta para EUG.*

4.3.2.2. Isoeugenol

La Figura 4.58 muestra los espectros de absorción UV-Visible registrados para la reacción enzimática entre IEUG y EPS a diferentes tiempos de reacción.

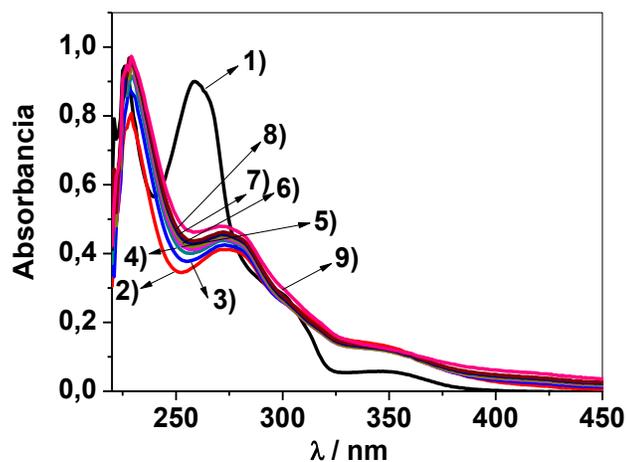


Figura 4.58. Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre IEUG y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 8. Tiempos de reacción: de 1) a 9) 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 180 s, respectivamente. $c_{IEUG}^* = 39 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu M$, $c_{EPS}^* = 40 nM$.

En la Figura 4.59 se muestra el correspondiente perfil de concentración en función del tiempo de reacción, obtenido después de aplicar el algoritmo RMC-MCA. Este comportamiento muestra que IEUG es co-sustrato de la EPS.

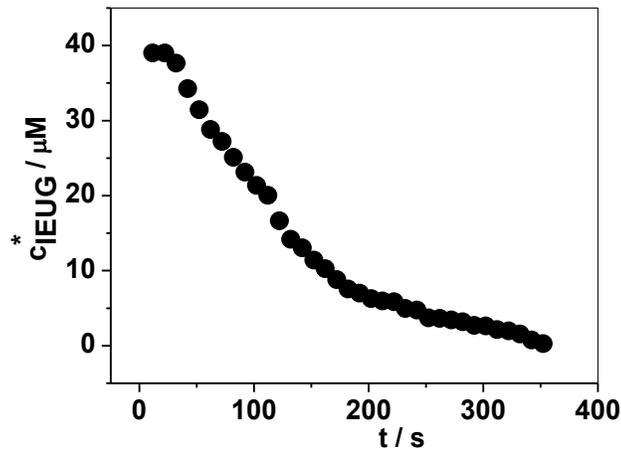


Figura 4.59. Perfiles de c_{IEUG}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 8. $c_{IEUG}^* = 39 \mu\text{M}$, $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu\text{M}$, $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$.

La Tabla 4.7 muestra el ANOVA obtenido usando un modelo de superficie de respuesta 2FI. Los valores de “Prob > F” menores o iguales a 0,0500 indican que los términos son significativos. De estos resultados, se puede inferir que los factores significativos en la determinación de v_i son c_{IEUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$. Además, se encontró que existen interacciones entre los factores c_{EPS}^* -pH y $c_{EPS}^* - c_{H_2O_2}^*$ (ver la ecuación 4.7).

Tabla 4.7. Análisis de ANOVA obtenido para un modelo de superficie de respuesta 2FI para IEUG.

Factor	Prob > F
A- c_{IEUG}^*	< 0,0001
B- c_{EPS}^*	0,2642
C- $c_{H_2O_2}^*$	0,0751
D-pH	0,2642

Interacciones	
BC	0,0183
BD	0,0103

Ecuación final en término de factores significativos e interacciones:

$$v_i = 5,43 + 0,06 c_{IEUG}^* - 210,2 c_{EPS}^* - 2,5 \times 10^{-3} c_{H_2O_2}^* - 0,58 \text{ pH} + 0,06 c_{EPS}^* c_{H_2O_2}^* + 24,7 c_{EPS}^* \text{ pH} \quad (4.7)$$

La Figura 4.60 muestra el gráfico de la superficie de respuesta obtenida a pH 8 y a $c_{EPS}^* = 40 \text{ nM}$, donde v_i se presenta como función de los dos factores significativos c_{IEUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$. Como en el caso de EUG, no se encontró un límite superior para la velocidad de reacción entre IEUG y EPS. La velocidad de reacción se incrementa a medida que las concentraciones de IEUG y de H_2O_2 también aumentan.

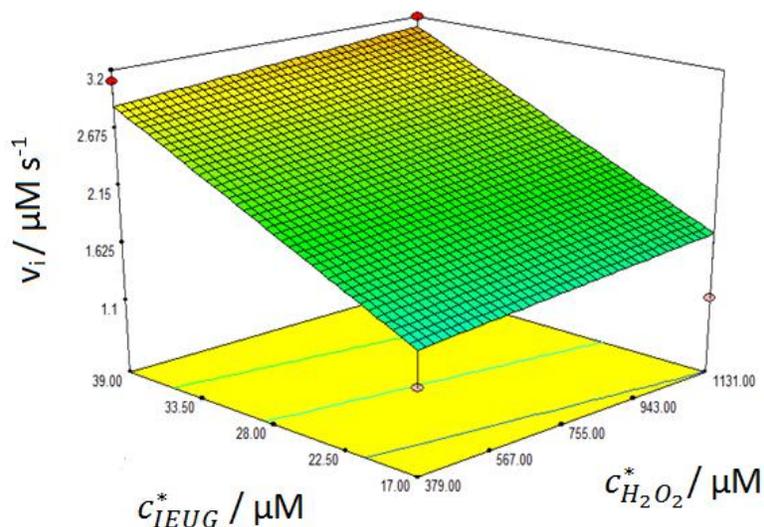


Figura 4.60. Gráfico de superficie de respuesta para IEUG.

4.3.2.3. Vainillina

La Figura 4.61 muestra los espectros de absorción UV-Visible registrados para la reacción enzimática entre VAI y EPS a diferentes tiempos de reacción.

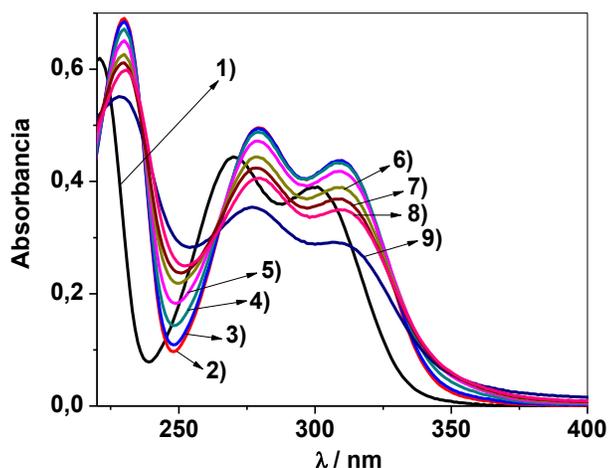


Figura 4.61. Espectros de absorción UV-Visible registrados para la cinética enzimática entre VAI y EPS a diferentes tiempos de reacción en 0,2 M SRF pH 5,2. Tiempos de reacción: de 1) a 9) 0; 1,4; 6,7; 18,7; 36,7; 60,7; 79,3; 98 y 213,7 s, respectivamente.

$$c_{VAI}^* = 77 \mu M, c_{H_2O_2}^* = 16 \mu M, c_{EPS}^* = 10 nM.$$

En la Figura 4.62 se muestra el correspondiente perfil de concentración en función del tiempo de reacción, obtenido después de aplicar el algoritmo RMC-MCA. Este comportamiento muestra que VAI es co-sustrato de la EPS.

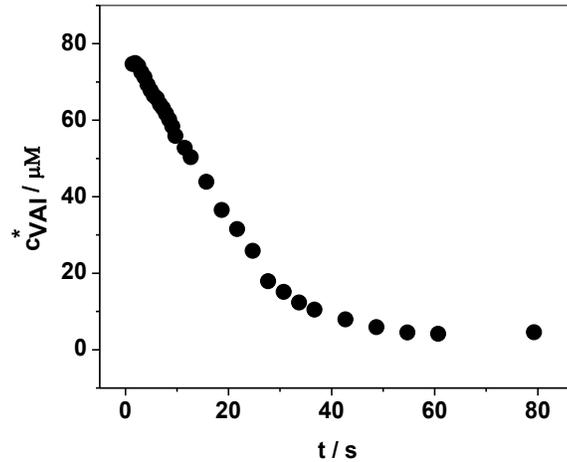


Figura 4.62. Perfiles de c_{VAI}^* en función del tiempo de reacción. Medio de reacción: 0,2 M SRF pH 5,2. $c_{VAI}^* = 77 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 16 \mu M$, $c_{EPS}^* = 10 nM$.

La Tabla 4.8 muestra el ANOVA obtenido para la cinética entre VAI y EPS, usando un modelo de superficie de respuesta 2FI. Los valores de “Prob > F” menores o iguales a 0,0500 indican que los términos son significativos. De estos resultados, se puede inferir que los factores significativos en la determinación de v_i son c_{EPS}^* , $c_{H_2O_2}^*$ y pH. Además, se encontró que existen interacciones entre los factores $c_{VAI}^* - c_{EPS}^*$, $c_{VAI}^* - c_{H_2O_2}^*$ y $c_{VAI}^* - pH$ (ver la ecuación 4.8).

Ecuación final en términos de factores significativos e interacciones:

$$v_i = 30,14 - 0,82 c_{VAI}^* - 248,38 c_{EPS}^* + 0,07 c_{H_2O_2}^* - 5,03 pH + 6,97 c_{VAI}^* c_{EPS}^* - 4,14 \times 10^{-3} c_{VAI}^* c_{H_2O_2}^* + 0,16 c_{VAI}^* pH \quad (4.8)$$

Tabla 4.8. Análisis de ANOVA obtenido para un modelo de superficie de respuesta 2FI para VAI.

Factor	Prob > F
A- c_{VAI}^*	0.8098
B- c_{SBP}^*	0.0181
C- $c_{H_2O_2}^*$	0.0185
D-pH	0.0137
Interacción	
A-B	0.0206
A-C	0.0978
A-D	0.0373

La Figura 4.63 muestra el gráfico de la superficie de respuesta obtenida para VAI a pH = 5,2 y a $c_{EPS}^* = 40$ nM. Tampoco se encontró un límite superior para la velocidad de reacción entre VAI y EPS.

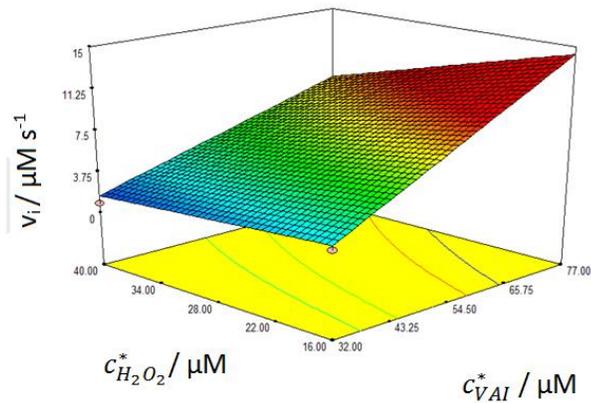


Figura 4.63. Gráfico de superficie de respuesta para VAI.

4.3.2.4. Parámetros cinéticos

La Tabla 4.9 resume la mejor combinación de los factores significativos encontrados para los tres antioxidantes, después de haber desarrollado la etapa de optimización.

Tabla 4.9. Factores significativos y combinación de factores que maximizan v_i , obtenidos después de la utilización de la metodología MSR.

	EUG	IEUG		VAI		
Factores significativos	c_{EUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$	c_{IEUG}^* y $c_{H_2O_2}^*$		c_{EPS}^* , $c_{H_2O_2}^*$, pH		
Interacciones	No hay	c_{EPS}^* - pH	c_{EPS}^* - $c_{H_2O_2}^*$	c_{VAI}^* - c_{EPS}^*	c_{VAI}^* - pH	c_{VAI}^* - $c_{H_2O_2}^*$
Mejor combinación de factores	$c_{EUG}^* = 379 \mu\text{M}$ $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu\text{M}$ pH 7,00	$c_{IEUG}^* = 39 \mu\text{M}$ $c_{H_2O_2}^* = 1112 \mu\text{M}$ $c_{EPS}^* = 0,040 \mu\text{M}$ pH 8,00		$c_{VAI}^* = 63 \mu\text{M}$ $c_{H_2O_2}^* = 17 \mu\text{M}$ $c_{EPS}^* = 0,040 \mu\text{M}$ pH = 5,20		

La Tabla 4.10 muestra las correspondientes K_M^{AP} , k_1 y k_3 determinadas para EUG, IEUG y VAI. Como se espera a partir de los principios teóricos, K_M^{AP} depende de $c_{H_2O_2}^*$. A partir de los valores de K_M^{AP} , es posible inferir que EUG es mejor co-sustrato de la EPS que IEUG, bajo condiciones experimentales similares. Por otro lado, al analizar los valores de K_M^{AP} para VAI, ésta sería el mejor co-sustrato (de los tres analizados) para EPS. VAI fue el único antioxidante donde el pH resultó ser un factor significativo para determinar v_i . Además, el mejor valor de $c_{H_2O_2}^*$ para VAI fue mucho menor que para EUG e IEUG.

La reacción de la EPS con H_2O_2 sería el paso determinante en la velocidad de reacción tanto para EUG como para IEUG. Por el contrario, k_1 y k_3 son prácticamente

iguales para VAI. Además, ellas son un orden de magnitud mayor que las correspondientes a EUG e IEUG.

Tabla 4.10. K_M^{AP} determinadas para EUG, IEUG y VAI usando el algoritmo RMC-MCA, y los correspondientes parámetros cinéticos k_1 y k_3 .

EUG pH 7.00		IEUG pH 8.00		VAI pH 5.20	
$c_{H_2O_2}^* / \mu M$	$K_M^{AP} / \mu M$	$c_{H_2O_2}^* / \mu M$	$K_M^{AP} / \mu M$	$c_{H_2O_2}^* / \mu M$	$K_M^{AP} / \mu M$
380	57 ± 6	380	130 ± 20	22	26 ± 3
560	84 ± 8	560	190 ± 30	28	33 ± 4
740	110 ± 10	740	240 ± 30	34	40 ± 5
1100	170 ± 20	1100	360 ± 40	40	46 ± 5
$k_1 / M^{-1} s^{-1}$	$(0,6 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2,0 \pm 0.2) \times 10^5$		$(7,0 \pm 0.5) \times 10^6$	
$k_3 / M^{-1} s^{-1}$	$(4,0 \pm 0.2) \times 10^5$	$(6,0 \pm 0.6) \times 10^5$		$(6,0 \pm 0.9) \times 10^6$	

4.4. Biosensores

4.4.1. Caracterización de la síntesis del compuesto OGRQ- β CD

La caracterización del compuesto OGRQ- β CD se realizó a través de medidas de espectroscopía de absorción UV-Visible. Estos resultados se compararon con aquellos obtenidos para el OG precursor. Según antecedentes bibliográficos, el OG muestra un máximo de absorción a $\lambda = 231$ nm, debido a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los dobles enlaces aromáticos y un máximo a $\lambda = 300$ nm, atribuido a una transición $n \rightarrow \pi^*$ de los enlaces C=O. Después de la reducción química con hidracina el OGRQ muestra un corrimiento de la banda de absorción de 231 nm a 264 nm (Guo y col., 2010; Guo y col., 2011).

En la Figura 4.64 se muestran los espectros de absorción del OG y del compuesto OGRQ- β CD. Como se puede observar, el OG muestra una banda alrededor de $\lambda = 298$ nm y un hombro a $\lambda = 241$ nm (línea negra en Figura 4.64). Por otro lado, el compuesto OGRQ- β CD, muestra la banda correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ disminuida, lo que pone de manifiesto que en la reducción química los grupos C=O desaparecen (línea roja en Figura 4.64).

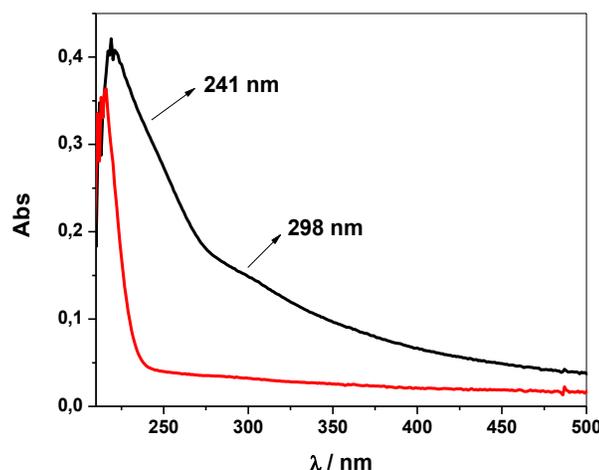


Figura 4.64. Espectros de absorción UV-Visible de (—) OG y (—) OGRQ- β CD.

Para mayor claridad, en las Figuras 4.65a y 4.65b se muestran los espectros de absorción de OG y del compuesto OGRQ- β CD, respectivamente, como así también las

correspondientes imágenes fotográficas, donde se observa que el OG tiene una coloración marrón, mientras que el compuesto OGRQ- β CD es de color negro.

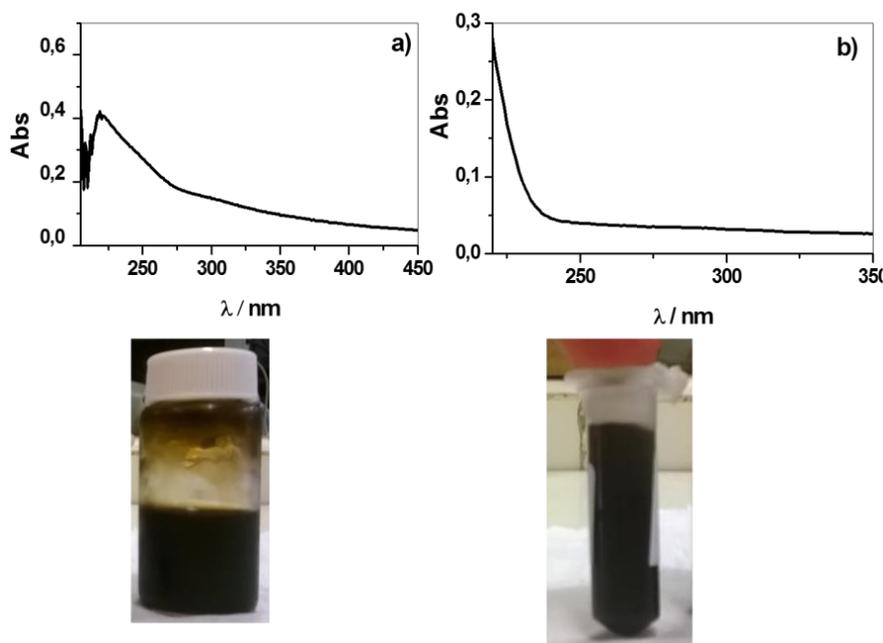


Figura 4.65. Espectros de absorción UV-Visible: a) OG y b) OGRQ- β CD. Al pie de la figura se muestran las correspondientes dispersiones.

4.4.2. Caracterización del conjugado EPS-ADA

A los efectos de verificar si la enzima EPS sufre algún cambio conformacional como consecuencia de su unión con ADA, se registraron los espectros de absorción UV-Visible de EPS y del conjugado EPS-ADA (Figura 4.66). Se puede observar que la enzima EPS muestra una banda de absorción a $\lambda = 402 \text{ nm}$, correspondiente a la banda “Soret” característica de las peroxidasas (Lu y col., 2013). Por otro lado, el conjugado EPS-ADA muestra una banda de absorción a $\lambda = 413 \text{ nm}$.

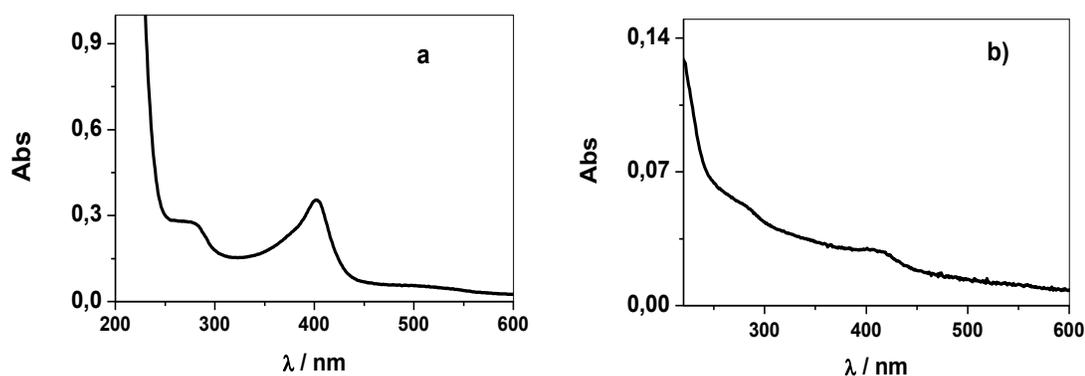


Figura 4.66. Espectros de absorción UV-Visible de: a) EPS y b) EPS-ADA. $c_{EPS}^* = 1,55 \times 10^{-4} M$. $c_{EPS-ADA}^* = 3,1 \times 10^{-5} M$.

Para verificar que la enzima, después de la conjugación con ADA, mantiene su actividad enzimática, se estudió su cinética enzimática, utilizando H_2O_2 como sustrato y EUG como co-sustrato. Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo esta reacción enzimática fueron las que mejores se encontraron para EUG (ver Tabla 4.9). Así, en la Figura 4.67 se muestra el espectro de absorción UV-Visible de EUG (línea 1 en Figura 4.67) y los espectros de absorción UV-Visible registrados durante el desarrollo de la reacción enzimática realizada usando el conjugado EPS-ADA (línea 2 en Figura 4.67). Aquí, claramente, se pone en evidencia que la enzima mantiene su actividad catalítica en el conjugado EPS-ADA, ya que es posible observar la aparición de una banda de absorción a $\lambda = 358 \text{ nm}$ que, como ya se mencionó anteriormente, corresponde a un intermediario inestable.

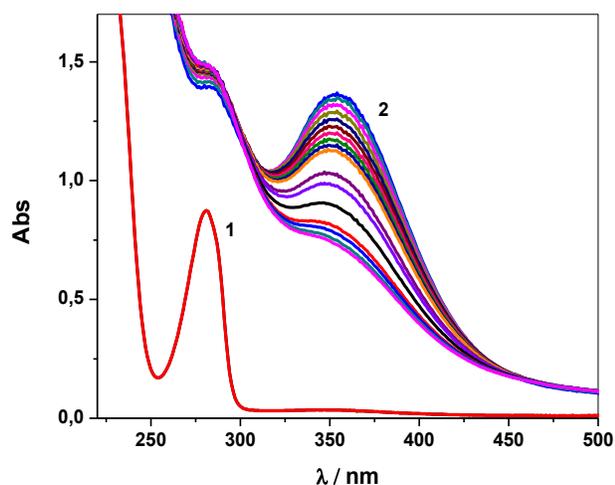


Figura 4.67. Espectros de absorción UV-Visible 1) EUG y 2) registrados a diferentes tiempos de reacción enzimática en 0,2 M en SRF pH 7. $c_{EUG}^* = 387 \mu M$ $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu M$,
 $c_{EPS-ADA}^* = 2,5 nM$.

Utilizando el algoritmo RMC-MCA se determinaron los perfiles de concentración de las distintas especies involucradas en la cinética enzimática. Así, en la Figura 4.68 se comparan los perfiles de concentración vs. tiempo obtenidos para EUG utilizando tanto la enzima EPS como el conjugado EPS-ADA. Como puede observarse si bien hasta un tiempo de 90 s la velocidad de decaimiento en la concentración de EUG es menor con el conjugado EPS-ADA respecto de la enzima EPS, después de ese tiempo la velocidad del conjugado es visiblemente mayor.

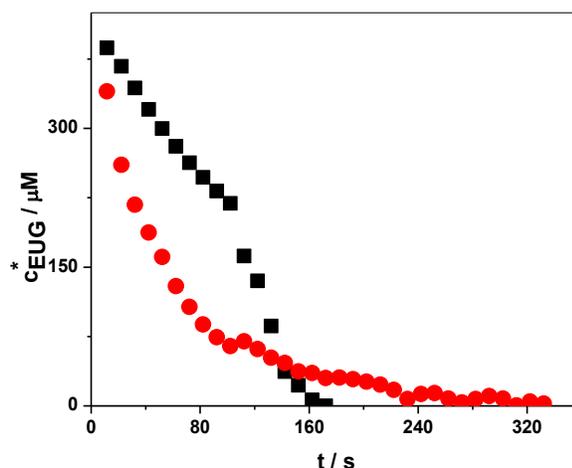


Figura 4.68. *Perfiles obtenidos mediante el algoritmo MCR-ALS para la concentración de EUG en función del tiempo cuando la cinética enzimática se realiza con EPS (●) y con EPS-ADA (■).*

4.4.3. Caracterización de las diferentes etapas de armado del biosensor

4.4.3.1. Caracterización mediante espectroscopía de impedancia electroquímica y voltamperometría cíclica

Se utilizaron la EIE y la VC para caracterizar las diferentes etapas en la construcción del biosensor. Las medidas se realizaron en una solución acuosa 1×10^{-3} M del par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ y 0,1 M KCl, a un potencial estacionario de 0,234 V vs Ag/AgCl.

En la Figura 4.69 se muestran los gráficos de Nyquist para los electrodos ECV, ECV/OGRQ-βCD, ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA y ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu.

Los circuitos equivalentes que mejor ajustaron para los distintos electrodos se muestran en la Figura 4.70.

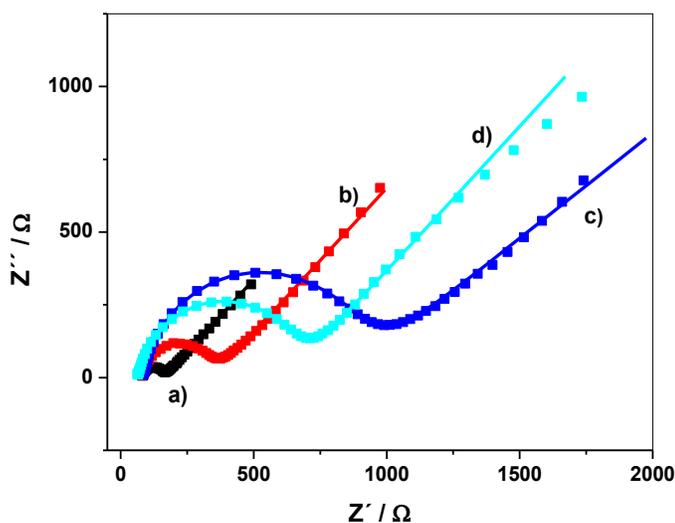


Figura 4.69. Gráficos de Nyquist correspondientes a los electrodos a) ECV, b) ECV/OGRQ-βCD, c) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA y d) ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu registrados en $1 \times 10^{-3} M$ de $[Fe(CN)_6]^{-4/-3} + 0,1 M$ KCl. Las líneas sólidas corresponden a los espectros de impedancia simulados.

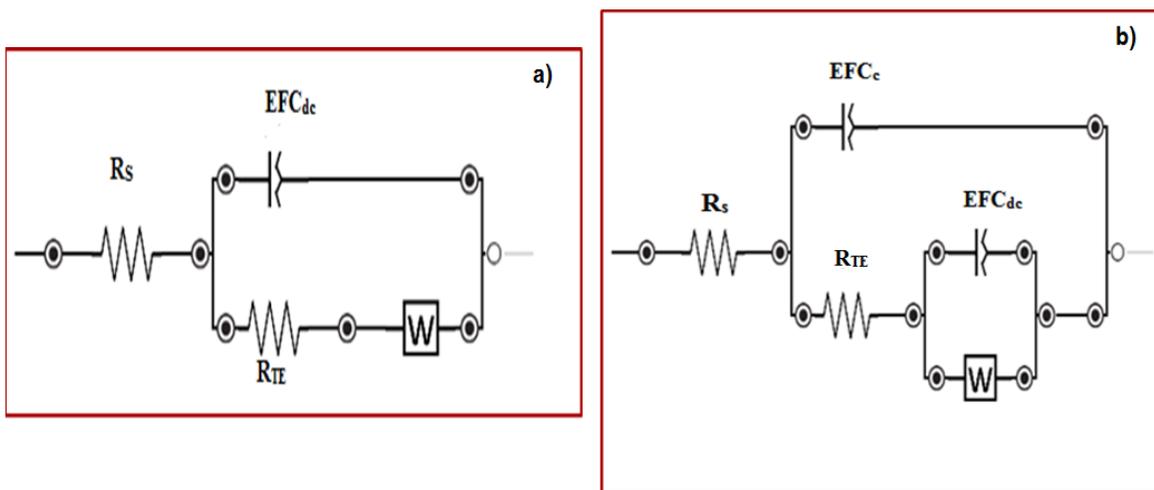


Figura 4.70. Circuitos equivalentes que mejor ajustaron: a) Circuito de Randless y b) Circuito utilizado por Casero y col. 2012.

- **Para el ECV:** el gráfico de Nyquist muestra, a altas frecuencias, un semicírculo debido al control cinético de la descarga electroquímica del par redox y, a bajas frecuencias, se observa una línea recta que representa al control difusional del par redox. El circuito equivalente de Randless (Figura 4.70a) es el que mejor ajusta los datos experimentales. En este circuito R_S es la resistencia de la solución, EFC_{dc} es el elemento de fase constante de la doble capa eléctrica, R_{TE} es la resistencia a la transferencia de carga y W es el elemento de Warburg. Se obtuvieron los siguientes valores para los mencionados elementos: $R_S = 80 \Omega$, $R_{TE} = 84 \Omega$, $EFC_{dc} = 3,14 \times 10^{-6} F s^{-0,85}$ y $W = 377 \Omega s^{-0,5}$.
- **Para el ECV/OGRQ- β CD:** el gráfico de Nyquist muestra un semicírculo y una línea recta. El circuito que mejor ajustó los datos experimentales fue el propuesto por Casero y col. (2012) (Figura 4.70b). Aquí EFC_c es el elemento de fase constante de un recubrimiento aislante que dificulta la transferencia electrónica. Para el OGRQ- β CD representa los grupos funcionales oxigenados que no fueron afectados por la reducción. Se obtuvieron, para los elementos que componen el circuito, los siguientes valores: $R_S = 78 \Omega$, $R_{TE} = 273 \Omega$, $EFC_{dc} = 5 \times 10^{-4} \Omega s^{-0,5}$, $EFC_c = 1,94 \times 10^{-6} F s^{-0,86}$ y $W = 1617 \Omega s^{-0,5}$.
- **Para el ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA:** el gráfico de Nyquist muestra un semicírculo y una línea recta. El circuito que mejor ajustó los datos experimentales fue el propuesto por Casero y col. (2012). Se obtuvieron, para los elementos que componen el circuito, los siguientes valores: $R_S = 85 \Omega$, $R_{TE} = 806 \Omega$, $EFC_{dc} = 5 \times 10^{-4} \Omega s^{-0,4}$, $EFC_c = 1,29 \times 10^{-6} F s^{-0,9}$ y $W = 2325 \Omega s^{-0,5}$.
- **Para el ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA /NPsAu:** el gráfico de Nyquist muestra un semicírculo y una línea recta. El circuito que mejor ajustó los datos experimentales fue el propuesto por Casero y col. (2012). Se obtuvieron, para los elementos que componen el circuito, los siguientes valores: $R_S = 65 \Omega$, $R_{TE} = 627 \Omega$, $EFC_{dc} = 1,67 \times 10^{-5} F s$, $EFC_c = 1,47 \times 10^{-6} F s^{-0,8}$ y $W = 1208 \Omega s^{-0,5}$.

Como es posible inferir de los resultados obtenidos, tanto el compuesto OGRQ- β CD como el conjugado EPS-ADA incrementan el valor de R_{TE} , dificultando la descarga del par redox. Mientras tanto, la incorporación de las NpsAu ha permitido disminuir el valor

de R_{TE} , permitiendo una mejora en la transferencia electrónica heterogénea. Este resultado permite validar la utilización de estas nanoestructuras en el desarrollo de este biosensor.

Por otra parte, en la Figura 4.71, se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a los electrodos ECV, ECV/OGRQ- β CD, ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA y ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA/NPsAu. Los mismos fueron registrados, al igual que en EIE, en una solución acuosa 1×10^{-3} M del par redox $[Fe(CN)_6]^{-4/-3}$ y 0,1 M KCl.

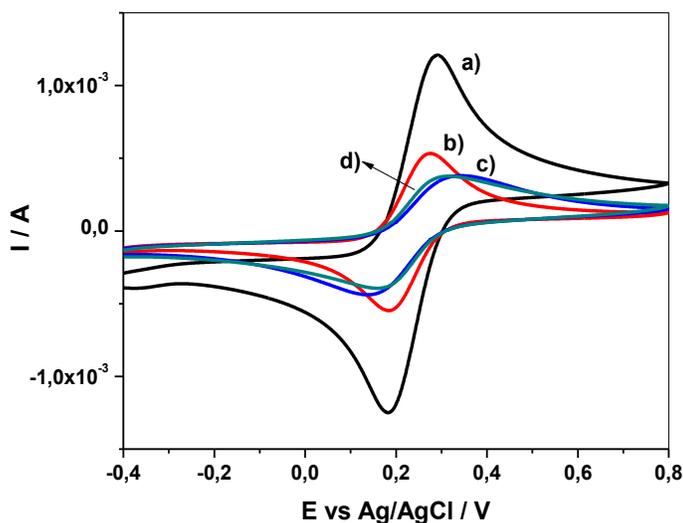


Figura 4.71. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a los electrodos a) ECV, b) ECV/OGRQ- β CD, c) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA y d) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA/NPsAu registrados en 1×10^{-3} M $[Fe(CN)_6]^{-4/-3}$ + 0,1 M KCl.

Aquí, para el ECV/OGRQ- β CD se obtiene un comportamiento inesperado en cuanto a una disminución en las $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ con respecto a aquellas obtenidas para ECV. Evidentemente, el compuesto OGRQ- β CD actúa como un aislante, dificultando la descarga del par redox en estudio. Sin embargo, cabe destacar que el ΔE_p pasa de 0,107 V vs Ag/AgCl para el ECV a 0,089 V vs Ag/AgCl para el ECV/OGRQ- β CD. Para el ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA también se observa una decaimiento en los valores de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ y un aumento de ΔE_p , su valor ahora es de 0,204 V vs Ag/AgCl. Finalmente, el ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA/NPsAu, prácticamente no hay variación en los valores de

las corrientes pero sí hay una disminución de ΔE_p , su valor es de 0,133 V vs Ag/AgCl, lo que valida aún más la incorporación de las NPsAu en el biosensor.

4.4.3.2. Caracterización mediante SEM-EDS

La morfología de la superficie de las diferentes etapas de armado del biosensor se investigó a partir del registro de imágenes SEM. La utilización de la técnica EDS (dispersión de longitud de onda por rayos X) en algunos casos, permite obtener un mapeo de los diferentes elementos presentes en la superficie estudiada.

En las Figuras 4.72 A y 4.72C se muestra el OG y en las Figuras 4.72B y 4.73D el OGRQ (si bien este último no tiene incorporadas las β CD, la técnica de reducción utilizada ha sido la de la vía química mediante hidracina). En la Figura 4.72A se observa una estructura arrugada y ondulada para el OG. En la Figura 4.72C, para el OGRQ se observa una estructura más irregular, plegable y enredada. Así, las imágenes SEM confirman la exfoliación y los cambios del OG a OGRQ (Diaz Nieto y col., 2018)

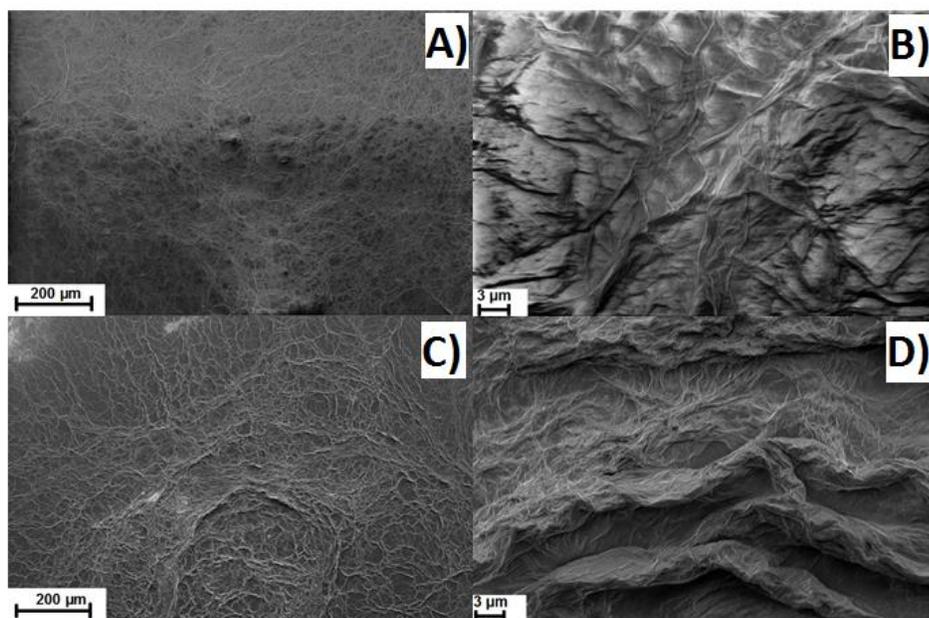


Figura 4.72. Imágenes SEM correspondientes a OG (A y C) y a OGRQ (B y D).

En la Figura 4.73 se muestra la imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ- β CD, mientras que en la Tabla 4.11 se muestra el porcentaje de cada uno de los elementos

encontrados sobre la superficie. Como es posible observar sólo hay presente C y O, constituyentes de las estructuras de ECV y ECV/OGRQ- β CD. En la Figura 4.74 se muestra la imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA, mientras que en Tabla 4.12 se muestra el porcentaje de cada uno de los elementos encontrados sobre la superficie. Aquí fue posible detectar, además de C y O, la presencia de Fe, el cual se relaciona con el grupo hemo característico de las peroxidasas. Si bien se detectó la presencia de otros elementos (P, K, Ca, Si, entre otros), los mismos no se muestran debido a que se encuentran en bajo porcentajes y su presencia se asigna a las soluciones reguladoras en que se encontraban alguno de los reactivos. En la Figura 4.75 se muestra la imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA/NPsAu, mientras que en la Tabla 4.13 se muestra el porcentaje de cada uno de los elementos encontrados sobre la superficie. Aquí se puede observar que, además de los elementos C y O, se detecta la presencia de Au, resultado de la generación de las NPsAu sobre la superficie del electrodo.

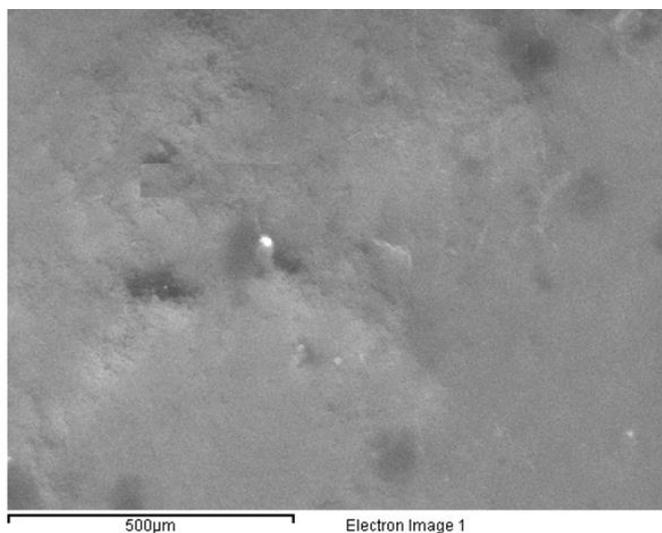


Figura 4.73. *Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ- β CD.*

Tabla 4.11. Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRQ- β CD.

Elemento	% en peso	% atómico
C	90.12	92.43
O	9.88	7.53
Total	100.00	

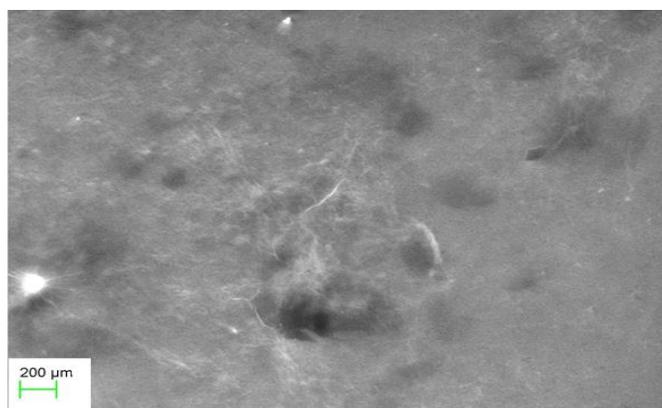


Figura 4.74. Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ- β CD/eps-ADA.

Tabla 4.12. Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRQ- β CD/eps-ADA.

Elemento	% en peso	% atómico
C	75.11	80.28
O	24.12	19.36
Fe	0.01	0.00
Total	100.00	

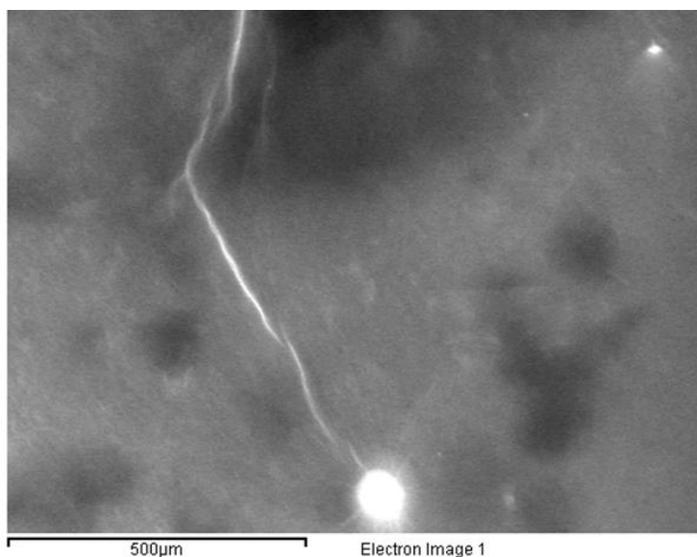


Figura 4.75. Imagen SEM correspondiente al ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu.

Tabla 4.13. Distribución de elementos sobre la superficie del ECV/OGRQ-βCD/EPS-ADA/NPsAu.

Elemento	% en peso	% atómico
C	71.74	78.24
O	25.85	21.17
Au	1.24	0.08
Total	100.00	

4.4.4. Biosensor para la determinación de peróxido de hidrógeno

4.4.4.1. Mejores condiciones de armado del biosensor

Selección de factores significativos

De la realización de la etapa de selección de factores significativos resultó que, para el biosensor enzimático amperométrico para la determinación de H₂O₂, los factores significativos son:

- Volumen del compuesto OGRQ- β CD a depositar sobre el ECV.
- Potencial de electrodeposición de las NPAus.
- Potencial aplicado (E_a) al ET durante la estabilización y los agregados de H_2O_2 .

Optimización de los factores significativos. Metodología de la superficie de respuesta

En el proceso de optimización se consideró también el pH al cual realizar las medidas amperométricas.

En primer lugar, cabe indicar que los datos experimentales debieron ser transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA, siendo la función empleada:

$$y' = 1/\sqrt{y}$$

(4.9)

Así, los resultados de la prueba de ANOVA con respecto al modelo cuadrático de MSR arrojan que las mejores condiciones de armado del biosensor para la determinación de H_2O_2 son las siguientes:

- **Volumen del compuesto OGRQ- β CD a depositar sobre el ECV:** 8,8 μ L
- **Potencial de electrodeposición de las NPAus:** -0,220 V vs Ag/AgCl.
- **E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H_2O_2 :**
-0,090 V vs Ag/AgCl.
- **pH al que se realizan las medidas amperométricas:** 6,33

4.4.4.2. Determinación de peróxido de hidrógeno

En la Figura 4.76 se muestran las respuestas amperométricas del biosensor frente a diferentes agregados de H_2O_2 . La condición de estado estacionario para cada agregado de H_2O_2 se alcanza a los 20 segundos.

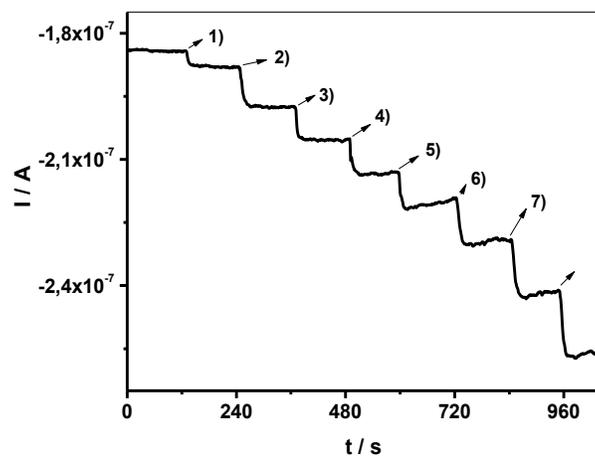


Figura 4.76. Respuestas amperométricas del biosensor hacia diferentes agregados de H_2O_2 . 1) $3 \times 10^{-5} M$, 2) $1 \times 10^{-4} M$, 3) $1,7 \times 10^{-4} M$, 4) $2,5 \times 10^{-4} M$, 5) $3,55 \times 10^{-4} M$, 6) $5 \times 10^{-4} M$, 7) $7 \times 10^{-4} M$, 8) $1 \times 10^{-3} M$.

La Figura 4.77 muestra la curva de calibración correspondiente para H_2O_2 , graficada como la corriente de estado estacionario, para cada agregado de H_2O_2 , menos la corriente de estado estacionario del blanco (ΔI_{EE}) vs $c_{H_2O_2}^*$.

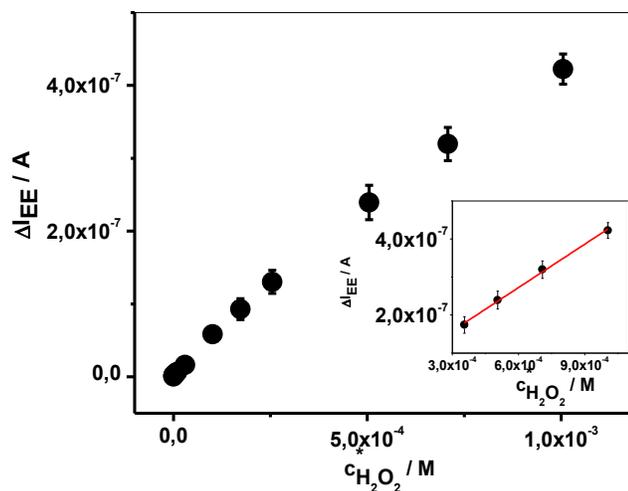


Figura 4.77. Curva de calibración correspondiente a las respuestas amperométricas mostradas en la Figura 4.76. En el inserto se muestra el intervalo lineal de la curva de calibración.

El intervalo lineal de la curva de calibración está entre 4×10^{-4} M y 1×10^{-3} M. La sensibilidad es de $(3,10 \pm 0,09) \times 10^{-4}$ A M⁻¹

El LOD, calculado según la nueva definición de la IUPAC (LOD = 3,3 s_o, Olivieri y Goicoechea, 2007), es 1×10^{-4} M y el LOQ es 4×10^{-4} M.

También, se calculó la K_M^{AP} a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{\Delta I_{EE}} = \frac{1}{I_{m\acute{a}x}} + \frac{K_M^{AP}}{I_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[C_{H_2O_2}^*]} \quad (4.10)$$

donde ΔI_{EE} ya se definió con anterioridad e $I_{m\acute{a}x}$ es la corriente máxima de saturación de H₂O₂. El valor de K_M^{AP} calculado para este biosensor fue de $(2,7 \pm 0,5) \times 10^6$ M.

4.4.4.3. Parámetros estadísticos del biosensor

La reproducibilidad del biosensor fue evaluada teniendo en cuenta las pendientes de las curvas de calibración construidas para tres electrodos diferentes. El valor del coeficiente de variación porcentual (% CV) fue del 8 %.

La repetibilidad fue evaluada comparando las pendientes de cinco curvas de calibración construidas con el mismo biosensor, utilizado en tres determinaciones. El % CV fue del 3 %.

El biosensor se conservó a 4 °C en 0,2 M SRF pH 7 mientras no se usó. En cuanto a la estabilidad del biosensor, a partir del día 24 se observó una disminución de la sensibilidad del 23 %, usándolo diariamente.

4.4.5. Biosensor para la determinación de eugenol

4.4.5.1 Mejores condiciones de armado del biosensor enzimático amperométrico para eugenol

Selección de factores significativos

En la Tabla 4.14 se muestran los resultados de ANOVA con respecto a la significatividad de los factores identificados por medio del diagrama de Ishikawa (Figura 3.5). Los valores de “Prob > F” menores a 0,0500 indican que los términos son significativos. Así, el potencial de electrodeposición de las NPsAu, el tiempo de electrodeposición de las NPsAu, el tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base), el E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG y la $c_{H_2O_2}^*$ resultan ser los cinco factores significativos de los 9 factores identificados.

Tabla 4.14. *Análisis de la varianza para el DFF. Factores significativos.*

Factor	Prob > F
Potencial de electrodeposición de las NPsAu	<i>0.0031</i>
Tiempo de electrodeposición de las NPsAu	<i>< 0.0001</i>
$c_{H_2O_2}^*$	<i>0.0002</i>
Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base)	<i>0.0007</i>
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG	<i>0.0004</i>

Optimización de los factores significativos. Metodología de la superficie de respuesta

Para cumplir con los supuestos de ANOVA, las respuestas debieron ser transformadas a:

$$y' = \log_{10}(y + k) \quad (4.11)$$

donde $k = 2,5 \times 10^{-5}$

De esta manera, los resultados de ANOVA con respecto al modelo lineal de MSR son los que se muestran en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Análisis de la varianza para el modelo lineal de la superficie de respuesta.

Factor	Prob > F
E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG	< 0,0001

De la lectura del resultado presentado en la Tabla 4.15 se desprende que el E_a al ET, durante la estabilización y los agregados de EUG, es el único factor que posee influencia sobre la respuesta, de los 5 estudiados durante la optimización

Por otra parte, el modelo que mejor describe la relación entre la respuesta y el factor mencionado en la Tabla 4.15 es un modelo del tipo lineal que se describe a continuación:

$$\log_{10}(y + 0) = -3,67 + 0,84 \times \text{potencial aplicado al ET en amperometría} \quad (4.12)$$

Finalmente, las mejores condiciones del armado del biosensor para EUG son las siguientes:

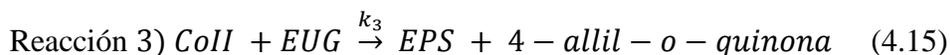
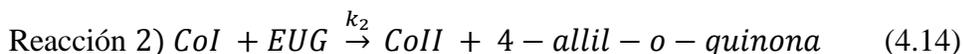
- **Potencial de electrodeposición de las NPsAu:** - 0,250 V
- **Tiempo de electrodeposición de las NPsAu:** 20,49 s

- **Tiempo de estabilización** del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base): 12,09 min
- **E_a al ET** durante la estabilización y los agregados de EUG: 0 V
- **c_{H₂O₂}***: 1 x 10⁻⁴ M

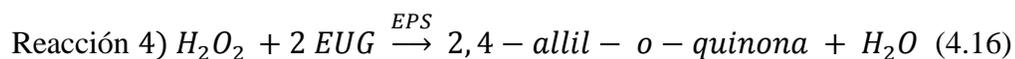
4.4.5.2. Elección del mejor potencial de trabajo

El E_a al ET durante las medidas amperométricas está relacionado con la reducción de la quinona (derivada de EUG), que es producto de la reacción enzimática entre EUG y EPS, al correspondiente catecol.

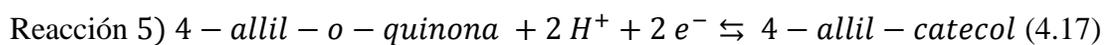
Kaffash y col. (2018) describen que la oxidación enzimática de los fenoles a o-quinonas electroactivas, por medio de peroxidasas, ocurre en tres pasos. Para el caso de la EPS, primero, en presencia de H₂O₂, es convertida en el compuesto CoI (ecuación 4.13). Luego, este compuesto convierte fácilmente el fenol (en este caso, EUG) al radical fenoxi correspondiente que, inmediata y selectivamente, se convierte en 4-allil-o-quinona (ecuaciones 4.14 y 4.15):



Las reacciones 1-3 pueden combinarse y dar la reacción global:



La 4-allil-o-quinona producida se puede reducir, reversiblemente, a 4-allil-catecol sobre la superficie del electrodo, como se muestra en la ecuación 4.17. La corriente electroquímica medida se atribuye a la reducción de la 4-allil-o-quinona y es proporcional a la concentración de o-quinona y está directamente relacionada con la concentración de EUG.



La reacción de la ecuación 4.16 ocurre en solución, mientras que la reacción de la ecuación 4.17 ocurre en la interfaz enzima-solución.

En la Figura 4.78 se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en 0,2 M SRF pH 7 en ausencia y en presencia de $c_{EUG}^* = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$. Es posible advertir, en presencia de EUG, un pico anódico alrededor de 0,400 V vs Ag/AgCl, que se atribuye a la oxidación electroquímica de EUG. Cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, se observa un pico catódico alrededor de 0,100 V vs Ag/AgCl que se atribuye a la reducción del producto de oxidación electroquímica de EUG.

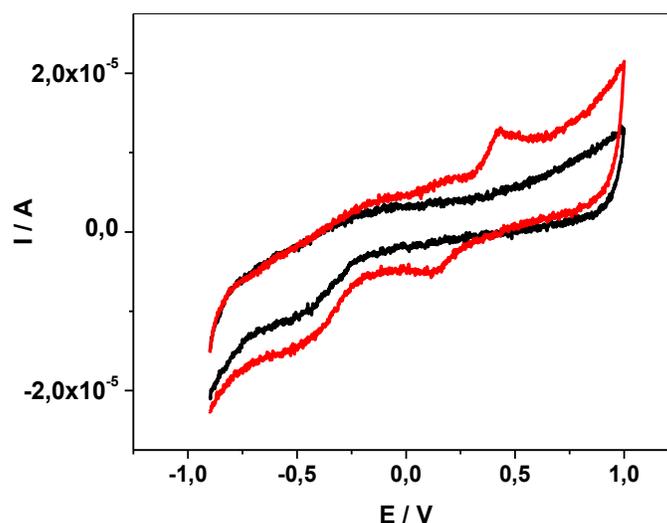


Figura 4.78. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en ausencia (—) y en presencia de $c_{EUG}^* = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$ (—) en 0,2 M SRF pH 7,00. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 4.79, se muestran voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en 0,2 M SRF pH 7,00 (negro), en presencia de $c_{H_2O_2}^* = 5 \times 10^{-4}$ M (rojo) y en presencia de $c_{H_2O_2}^* = 5 \times 10^{-4}$ M y $c_{EUG}^* = 6 \times 10^{-4}$ M (azul). Como puede observarse, en presencia de H_2O_2 , el comportamiento de EUG es diferente. Esto pone en evidencia la necesidad de contar con el H_2O_2 para lograr iniciar el ciclo catalítico de la enzima. Para este caso, se observa un pequeño pico de oxidación correspondiente a la oxidación enzimática de EUG. Además, se observa, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, un pico catódico, asignado a la reducción de la 4-allil-quinona, generada como producto de la reacción enzimática entre EUG y EPS. Además, en verde, se observan los voltamperogramas cíclicos registrados a continuación del voltamperograma cíclico azul. De aquí es posible inferir que se genera la cupla redox quasi-reversible 4-allil-quinona/4-allil-catecol.

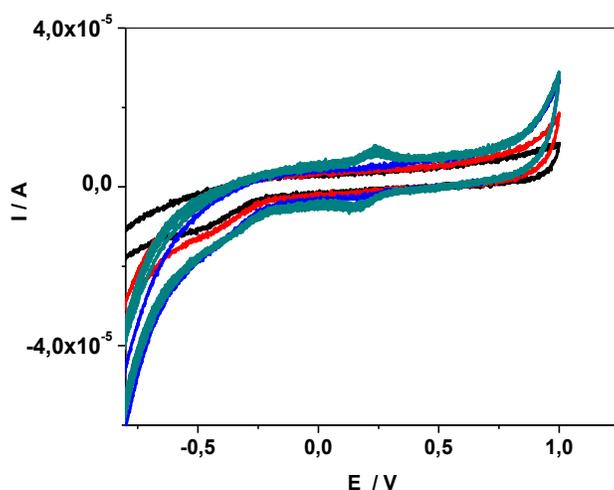


Figura 4.79. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al biosensor en 0,2 M SRF pH 7,00 (—), en presencia de $c_{H_2O_2}^* = 5 \times 10^{-4}$ M (—), en presencia de $c_{H_2O_2}^* = 5 \times 10^{-4}$ M y $c_{EUG}^* = 6 \times 10^{-4}$ M (—) y los barridos consecutivos registrados a continuación de (—) (—). $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

De la Figura 4.79, se puede observar que, si el E_a para realizar las medidas amperométricas es 0 V vs Ag/AgCl, se estaría reduciendo la 4-allil-o-quinona a 4-allil-

catecol, y este sería el origen de los cambios en las corrientes observados durante las medidas amperométricas.

Para demostrar que a 0 V se está sensando un analito que es producto del ciclo catalítico de la enzima, se realizaron dos medidas amperométricas a ese potencial en ausencia de enzima y en ausencia de H_2O_2 . En la Figura 4.80 se muestra una medida amperométrica correspondiente al ECV/OGRQ- β CD/NPsAu, es decir, no se ha inmovilizado el conjugado EPS-ADA. Como se puede observar, si bien se presentan algunas modificaciones, la corriente vuelve a su valor de base y permanece inalterada frente a los agregados de EUG.

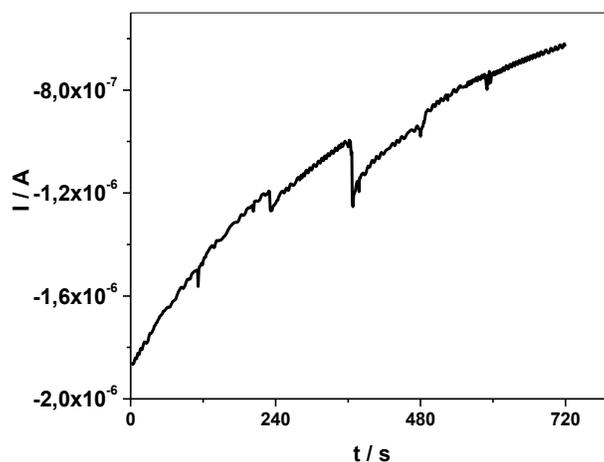


Figura 4.80. Medida amperométrica correspondiente al ECV/OGRQ- β CD/NPsAu en presencia de $c_{H_2O_2}^* = 1 \times 10^{-4}$ M frente a diferentes agregados de EUG: 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M y 1×10^{-4} M ($t = 120, 240, 360, 480$ y 600 s. $E_a = 0$ V).

De manera similar, en la Figura 4.81 se muestra una medida amperométrica del biosensor, en ausencia de H_2O_2 . Tampoco en este caso se ven alteradas las corrientes por los agregados de EUG, que comienzan a los 1500 s.

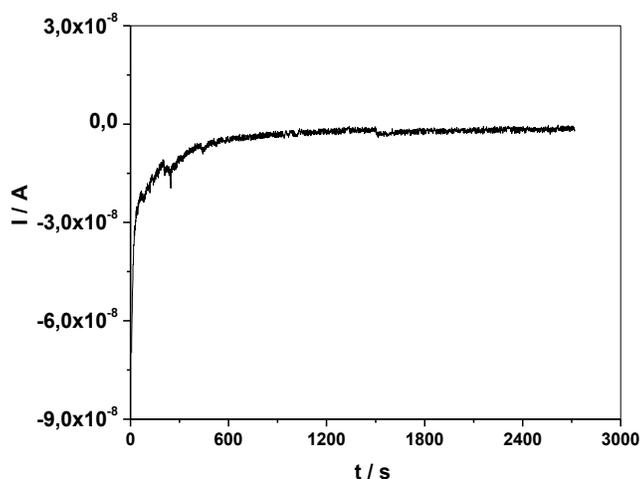


Figura 4.81. Medida amperométrica correspondiente al biosensor en ausencia de H_2O_2 frente a diferentes agregados de EUG: $1 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-5} M$, $5 \times 10^{-5} M$ y $1 \times 10^{-4} M$ ($t = 1500, 1800, 2100$ y 2400 s, respectivamente). $E_a = 0$ V.

4.4.5.3. Determinación de eugenol

En la Figura 4.82 se muestran las respuestas amperométricas del biosensor frente a diferentes agregados de EUG, en presencia de $1 \times 10^{-4} M$ de H_2O_2 . La condición de estado estacionario, para cada agregado de EUG, se alcanza a los 30 segundos.

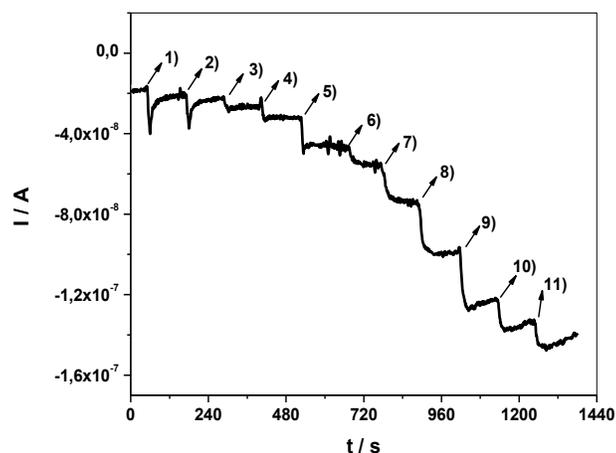


Figura 4.82. Respuestas amperométricas del biosensor hacia diferentes agregados de EUG. 1) $1 \times 10^{-7} M$, 2) $3 \times 10^{-7} M$, 3) $5 \times 10^{-7} M$, 4) $1 \times 10^{-6} M$, 5) $3 \times 10^{-6} M$, 6) $5 \times 10^{-6} M$, 7) $1 \times 10^{-5} M$, 8) $3 \times 10^{-5} M$, 9) $6 \times 10^{-5} M$, 10) $8 \times 10^{-5} M$ y 11) $1 \times 10^{-4} M$.

La Figura 4.83 muestra la curva de calibración correspondiente para EUG, graficada como ΔI_{EE} vs C_{EUG}^* .

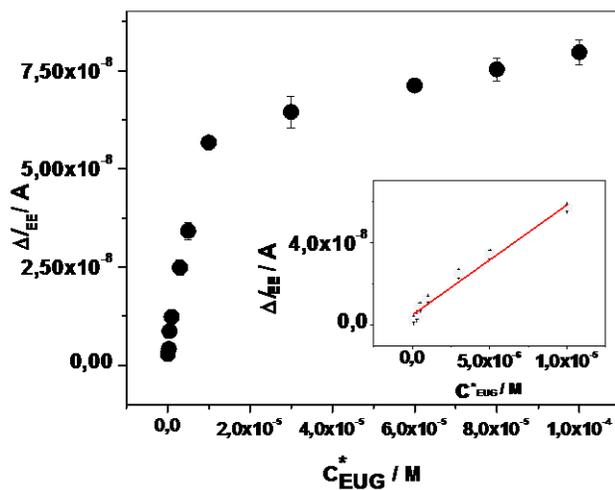


Figura 4.83. Curva de calibración correspondiente a la respuesta amperométrica mostrada en la Figura 4.82. En el inserto se muestra el intervalo lineal de la curva de calibración.

El intervalo lineal de la curva de calibración está entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-5} M. La sensibilidad es de $(7,4 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ A M⁻¹

El LOD, calculado según la nueva definición de la IUPAC (LOD = 3,3 s_o, Olivieri y Goicoechea, 2007) es $3,1 \times 10^{-8}$ M y el LOQ es 1×10^{-7} M.

4.4.5.4. Parámetros estadísticos del biosensor

La reproducibilidad del biosensor se evaluó teniendo en cuenta las pendientes de las curvas de calibración construidas para cinco electrodos diferentes. El % CV fue del 8 %.

La repetibilidad se evaluó comparando las pendientes de tres curvas de calibración construidas para un mismo biosensor, utilizado en tres determinaciones. El % CV fue del 3 %.

En cuanto a la estabilidad del biosensor es posible mencionar que la sensibilidad se mantuvo constante durante 15 días. Luego, el valor de la sensibilidad disminuye un 30 %.

4.4.5.5. Muestras reales

Muestra N°1: Cemento de restauración



Figura 4.84. *Cemento de restauración intermedia.*

Composición de la muestra real

Se adquirió comercialmente una muestra de uso odontológico, más precisamente un cemento de restauración intermedia (Figura 4.84). Dicho producto se encuentra formado por un líquido y un polvo. Los datos proporcionados por el fabricante indican que el líquido contiene EUG y ácido acético (AcH) y el polvo ZnO y polimetacrilato de metilo)

En primer lugar, se procedió a medir el pH del líquido en cuestión. El mismo arrojó un valor de 3,68. Este valor, junto al valor de la constante de acidez del AcH ($1,75 \times 10^{-5}$), indica una concentración de AcH en la muestra de $2,47 \times 10^{-3}$ M.

Luego, para conocer más acerca de la composición del líquido se procedió a registrar un espectro UV-Visible. Se llevó a cabo una dilución 1:1000 de la muestra en 0,2 M SRF pH 7. En la Figura 4.85 se muestran los espectros UV-Visible de la muestra y de EUG adquirido comercialmente.

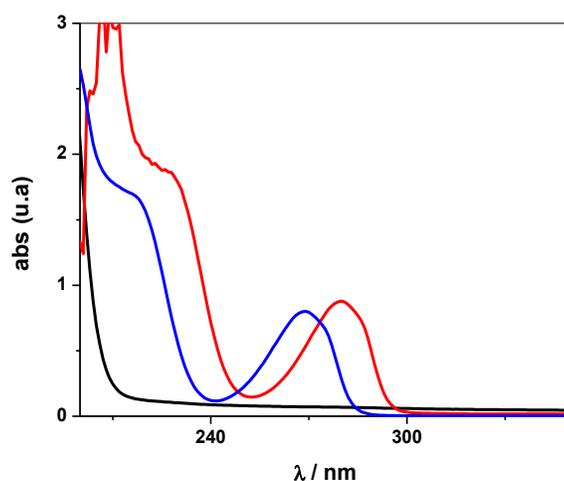


Figura 4.85. Espectros UV-Visible correspondientes a 0,2 M SRF pH 7(—), muestra (—) y EUG comercial (—) ($c_{EUG} = 3 \times 10^{-4}$ M).

A partir de la absorbancia a $\lambda = 278$ nm para la muestra real y considerando el valor de ϵ de EUG al pH trabajado ($2630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), fue posible estimar la concentración de EUG presente en la muestra real. Este valor fue de $3,77 \times 10^{-1}$ M.

Ensayos de recuperación sólo con el líquido de la muestra

Se llevó a cabo una dilución 1:100 de la muestra en 0,2 M SRF pH 7. Después de obtener la estabilización del biosensor en la solución reguladora (a 0 V vs Ag/AgCl), se inyectó una alícuota de la muestra diluida en la celda electroquímica. Luego, se agregaron diferentes alícuotas de EUG comercial cada dos minutos. La Figura 4.86 muestra el amperograma obtenido después de estas adiciones. En la Tabla 4.16 se muestran las concentraciones de las soluciones preparadas y aquellas obtenidas mediante el método de la adición estándar, con los correspondientes porcentajes de recuperación. Los valores de recuperación con el líquido de la muestra variaron entre el 91 y 120 %, lo que muestra que este biosensor puede ser utilizado en la determinación de EUG en esta muestra.

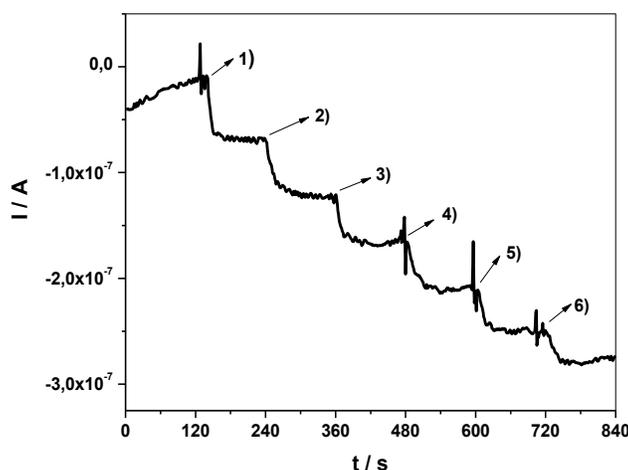


Figura 4.86 Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real (7×10^{-6} M) y diferentes alícuotas (2-6) de EUG comercial. Finalmente en celda $c_{EUG}^* = 7,5 \times 10^{-6}$ M, 8×10^{-6} M, $8,5 \times 10^{-6}$ M, 9×10^{-6} M y $9,5 \times 10^{-6}$ M de 2) a 6), respectivamente.

Tabla 4.16. *Determinación de EUG en un cemento de restauración intermedia
utilizando sólo el líquido.*

C agregada / M	c_{EUG}^* / M	% recuperación
$3,5 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-6}$ $\pm 3 \times 10^{-7}$	105
	$3,4 \times 10^{-6}$ $\pm 4 \times 10^{-7}$	97
7×10^{-6}	$6,3 \times 10^{-6}$ $\pm 1 \times 10^{-7}$	91
	7×10^{-6} $\pm 3 \times 10^{-7}$	100
	$6,5 \times 10^{-6}$ $\pm 1 \times 10^{-7}$	94
$1,3 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$ $\pm 4 \times 10^{-6}$	100
	$1,6 \times 10^{-5}$ $\pm 5 \times 10^{-6}$	120

Ensayos de recuperación con pasta

Se preparó el cemento mezclando, según lo indicado por el proveedor, el líquido con el polvo. Inmediatamente, la pasta preparada se endureció. Se procedió a diluir 1:10 con 0,2 M SRF pH 7,00 y se dejó en reposo toda una noche. Esto se realizó ya que cuando el EUG se une al ZnO ocurre una reacción de quelación, formándose eugenolato de zinc

(ZOE). Cuando el ZOE se expone a un medio acuoso, como la saliva (o la 0,2 M SRF pH 7 en nuestra experiencia), ocurre la hidrólisis, dando EUG e ZnOH (Markowitz y col., 1992). Luego, se extrajo del sobrenadante de la preparación anterior una alícuota de muestra y se procedió a realizar una dilución 1:100.

Después de obtener la estabilización del biosensor en la solución reguladora (a 0 V vs Ag/AgCl), se inyectó una alícuota de la muestra diluida en la celda electroquímica. Luego, se agregaron diferentes alícuotas de EUG comercial cada dos minutos. La Figura 4.87 muestra el amperograma obtenido después de estas adiciones. En la Tabla 4.17 se muestran las concentraciones de las soluciones preparadas y aquellas obtenidas mediante el método de la adición estándar, con los correspondientes porcentajes de recuperación. Los valores de recuperación con la mezcla líquido-ZnO variaron entre el 93 y 113 %, lo que muestra que este biosensor puede ser utilizado en la determinación de EUG en esta forma de la muestra.

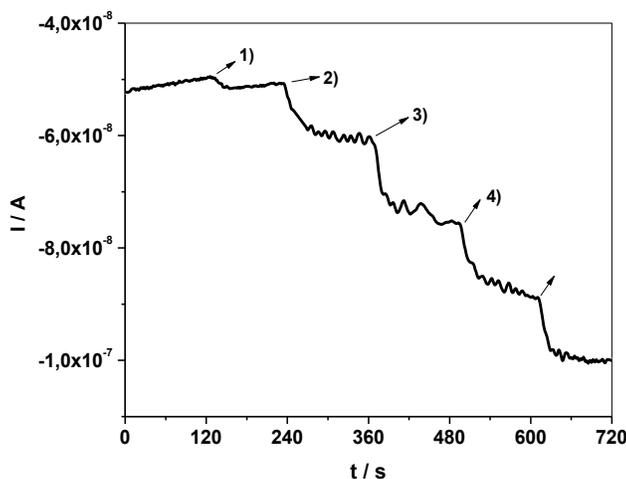


Figura 4.87. Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real ($3 \times 10^{-6} M$) y diferentes alícuotas (2-5) de EUG comercial. Finalmente en celda, $c_{EUG}^* = 3,5 \times 10^{-6} M$, $5 \times 10^{-6} M$, $7,5 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-5} M$ de 2) a 5), respectivamente.

Tabla 4.17. *Determinación de EUG en un cemento de restauración intermediaaria utilizando el líquido y el polvo.*

C agregada / M	c_{EUG}^* / M	% recuperación
5×10^{-7}	$5,4 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-8}$	108
3×10^{-6}	$2,9 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-7}$	97
	$2,8 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}$	93
5×10^{-6}	$4,9 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}$	97
	$5,6 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-7}$	113

Muestra N°2: Dentolina Fucus



Figura 4.88. *Dentolina Fucus.*

Características de la muestra

La muestra “Dentolina Fucus” (Figura 4.88) también fue adquirida comercialmente. En la Tabla 4.18 se presentan los datos que el fabricante proporciona acerca de su composición.

Tabla 4.18. *Composición de la muestra real “Dentolina Fucus”*

Componente	Cantidad (cada 1 ml)
EUGENOL	46,9 mg
CREOSOTA VEGETAL	142 mg
CLORHIDRATO DE PROCAÍNA	49,6 mg
CLOROFORMO	287 mg
ALCOHOL	1 ml

En la Figura 4.89 se presenta la estructura química de la creosota vegetal o guaicol (GUA).

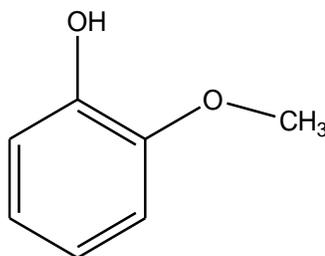


Figura 4.89. *Estructura química de GUA.*

Como se puede observar a partir de la Figura 4.89 el GUA es un fenol, de características estructurales similares a las de EUG y se supone que GUA es sustrato de las peroxidasas.

En la Figura 4.90 se muestran los voltamperogramas cíclicos de EUG, GUA y de la muestra registrados sobre la superficie del biosensor en 0,2 M SRF pH 7,00.

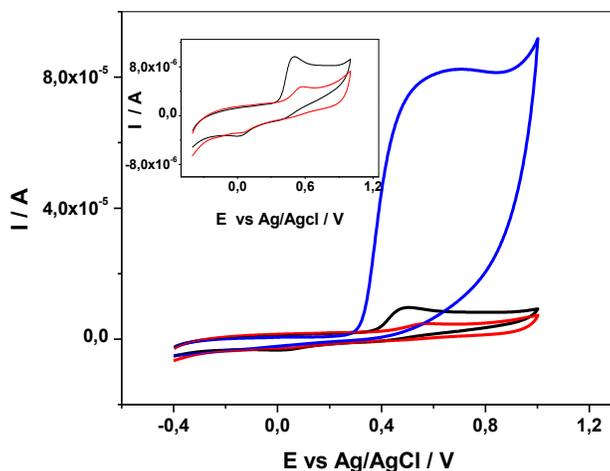


Figura 4.90. Voltamperogramas cíclicos de EUG (—), GUA (—) y Muestra (—) registrados sobre la superficie del biosensor en 0,2 M SRF pH 7. c_{EUG}^* , c_{GUA}^* y de $c_{Muestra}^* = 1 \times 10^{-3} M$.

Como se puede observar de la Figura 4.90, tanto EUG como GUA presentan un pico de reducción alrededor de 0 V vs Ag/AgCl, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial. Dicho comportamiento, plantea la hipótesis de que GUA podría ser un interferente en la detección de EUG, para esta muestra real en particular, y que los porcentajes de recuperación podrían llegar a estar por encima del 100 %.

Ensayos de recuperación

Se llevó a cabo una dilución 1:100 y 1:1000 de la muestra en 0,2 M SRF pH 7. Después de obtener la estabilización del biosensor en la solución reguladora (a 0 V vs Ag/AgCl), se inyectó una alícuota de la muestra diluida (ya sea de la 1:100 o de la 1:1000 según correspondía) en la celda electroquímica. Luego, se agregaron diferentes alícuotas de EUG comercial cada dos minutos. La Figura 4.91 muestra el amperograma obtenido después de estas adiciones. En la Tabla 4.19 se muestran las concentraciones de las

soluciones preparadas y aquellas obtenidas mediante el método de la adición estándar, con los correspondientes porcentajes de recuperación.

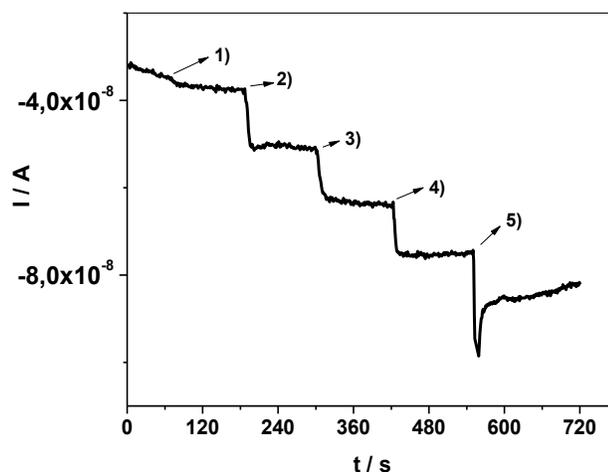


Figura 4.91. Respuestas amperométricas del biosensor ante el agregado de una alícuota de muestra real (3×10^{-6} M) y diferentes alícuotas (2-5) de EUG comercial. Finalmente en celda, $c_{EUG}^* = 3,5 \times 10^{-6}$ M, 5×10^{-6} M, $7,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-5} M de 2) a 5), respectivamente.

Tabla 4.19. Determinación de EUG en *Dentolina Fucus*.

C agregada / M	c_{EUG}^* / M	% recuperación
5×10^{-7}	$4,7 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-8}$	94
	$4,4 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-8}$	87
1×10^{-6}	$9,2 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-7}$	92
	$9,8 \times 10^{-7} \pm 4 \times 10^{-7}$	98

5×10^{-6}	$5,3 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}$	107
	$4,6 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-7}$	93

De la Tabla 4.19 se observa que los porcentajes de recuperación se encuentran alrededor del 100 %, lo que refuta la hipótesis de que GUA sería un interferente para la detección de EUG. En realidad, GUA presenta una cinética de reacción mucho más lenta que para EUG frente a la EPS. Luego, el tiempo de respuesta para este biosensor es superior en el caso de GUA. En la Figura 4.92 se presentan las respuestas amperométricas ante agregados de GUA y de EUG. Para GUA (amperograma negro, Figura 4.92), se realiza una inyección a los 360 s y otra a las 480 s. El tiempo de respuesta de GUA es de, aproximadamente, 110 s. Para EUG (amperograma rojo, Figura 4.92) se realiza una inyección a los 400 s y otra a los 520 s. El tiempo de respuesta de EUG es de, aproximadamente, 8 s. Esta marcada diferencia en los tiempos de respuesta demuestra que, bajo las condiciones experimentales trabajadas, se está sensando EUG y que GUA no es un interferente.

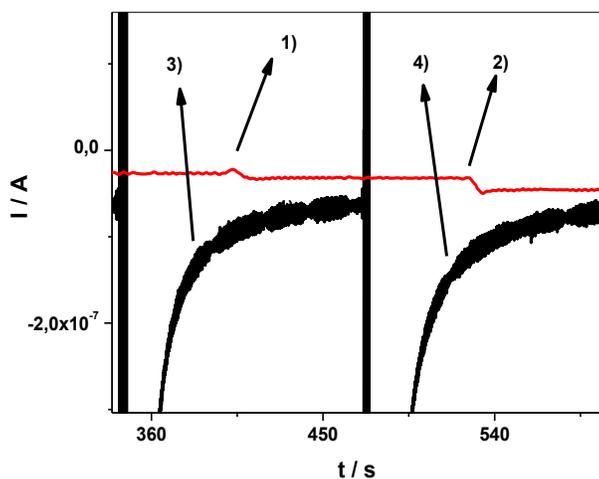


Figura 4.92. Respuestas amperométricas del biosensor ante diferentes agregados EUG (—) y GUA (—). 1 y 3) 5×10^{-6} M, 2 y 4) $7,5 \times 10^{-6}$ M.

4.4.6. Blancos de reacción

4.4.6.1. Blancos espectrofotométricos

Con el propósito de demostrar que se desarrolla el ciclo catalítico característico de la EPS y que el mismo necesita tanto de la presencia de H_2O_2 como de co-sustrato, en la Figura 4.93a se muestran los espectros UV-Visible correspondientes a una mezcla de reacción formada por EUG y H_2O_2 , para diferentes tiempos de reacción. En la Figura 4.93b se muestran los resultados análogos con respecto a EUG y EPS.

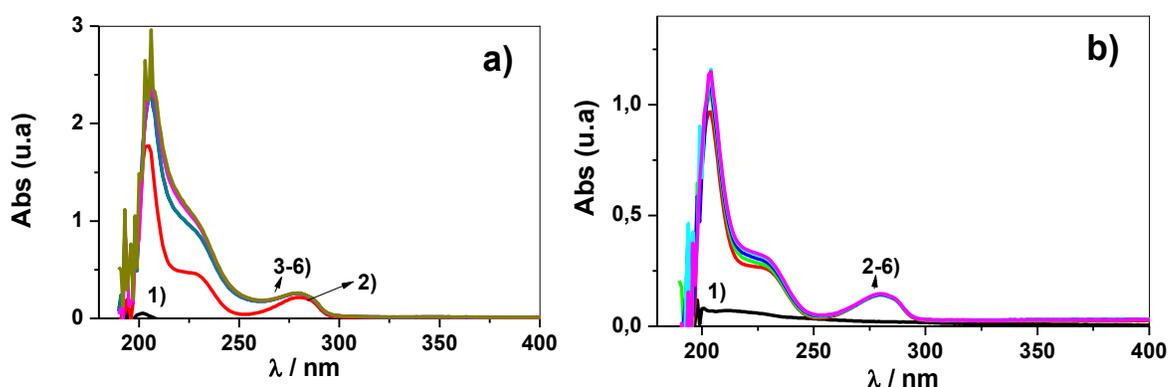


Figura 4.93. Espectros UV-Visible en presencia de a) 1) 0,2 M SRF pH 7, 2-6) $c_{EUG}^* = 3 \times 10^{-4} M$ y $c_{H_2O_2}^* = 3 \times 10^{-4} M$ a $t = 10, 120, 300$ y 600 s, respectivamente. b) 1) 0,2 M SRF pH 7, 2-6) $c_{EUG}^* = 3 \times 10^{-4} M$ y $c_{EPS}^* = 4 \times 10^{-4} M$ a $t = 10, 120, 300$ y 600 s respectivamente.

Como se puede observar, tanto en el caso en que EPS esté ausente (Figura 4.93a) como en el caso en que este ausente H_2O_2 (Figura 4.93b), la banda de absorción situada a $\lambda = 280$ nm, característica de EUG, permanece inalterada. Tampoco, se observa la formación del intermediario de reacción, descrito con anterioridad, cuya banda de absorción se define a $\lambda = 358$ nm.

4.4.6.2. Blancos electroquímicos

A continuación, se mostrarán las respuestas amperométricas correspondientes a:

1. ECV/OGRQ β CD
2. ECV/OGRQ β CD/NPsAu (no se dio lugar a la incubación en EPS-ADA)
3. ECV/OGRQ β CD/EPS-ADA (no se electro-depositaron las NPsAu)
4. ECV/OGRQ β CD/NPsAu/EPS-ADA en ausencia de H₂O₂

Para los casos 1, 2 y 3 se registró la respuesta del electrodo tanto para diferentes agregados de H₂O₂ (biosensor de H₂O₂), como para diferentes agregados de EUG (biosensor de EUG).

En la Figura 4.94 se muestran los casos 1,2 y 3 ante diferentes agregados de H₂O₂.

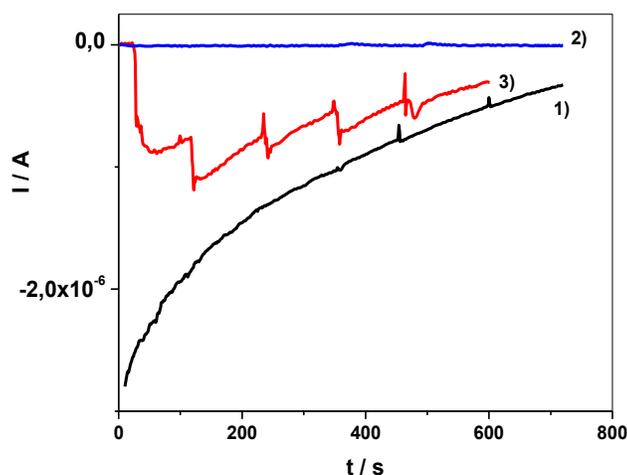


Figura 4.94. Respuestas amperométricas de 1) ECV/OGRQ- β CD, 2) ECV/OGRQ- β CD/NPsAu y 3) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA en 0,2 M SRF pH 7,00 ante diferentes agregados de H₂O₂: 3×10^{-5} M, 7×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M y 1×10^{-3} M a los 120, 240, 360, 480, 600 y 720 s, respectivamente. $E_a = 0,090$ V vs Ag/AgCl.

Como se puede observar, en los casos 1 y 2 no existen modificaciones en la corriente de base ante los agregados de diferentes alícuotas de H₂O₂. En el caso 2, esto es de esperar ya que la EPS no está presente en el sensor. Para el caso 3, se puede observar de qué manera, debido a la ausencia de las NPsAu, el biosensor demora más en alcanzar estabilidad, ante los agregados de H₂O₂. Esto permite justificar el uso de las NPsAu para mejorar la transferencia electrónica.

A continuación, en la Figura 4.95a, se muestran los resultados análogos, es decir los casos 1, 2 y 3 para el biosensor de EUG. En la Figura 4.95b, se muestran, de forma ampliada, los casos 1 y 3.

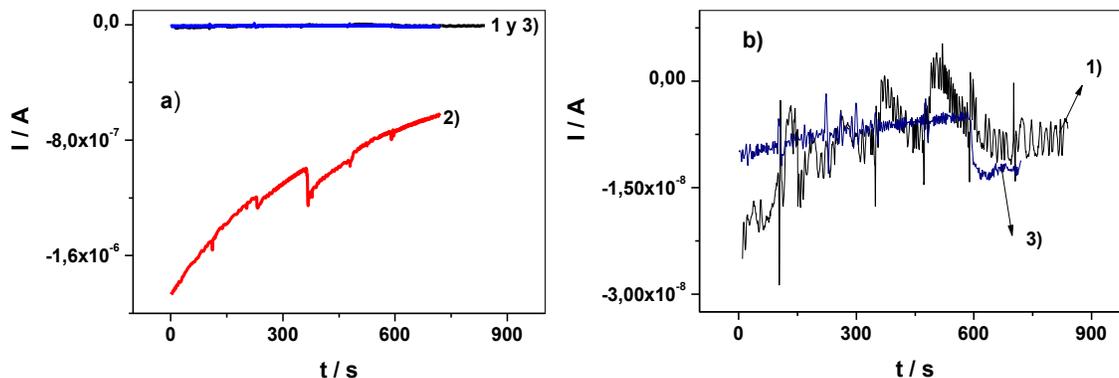


Figura 4.95. Respuestas amperométricas de 1) ECV/OGRQ- β CD, 2) ECV/OGRQ- β CD/NPsAu y 3) ECV/OGRQ- β CD/EPS-ADA en 0,2 M SRF pH 7,00 ante diferentes agregados de EUG: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} y 1×10^{-4} M a los 120, 240, 360, 480, 600 y 720 s, respectivamente. $E_a = 0$ V vs Ag/AgCl.

En esta oportunidad, en ninguno de los tres casos se observan prácticamente cambios en la corriente ante los agregados de EUG.

Falta explicar qué ocurre con el biosensor, en ausencia de H_2O_2 , ante los diferentes agregados de EUG (caso 4). Este resultado fue mostrado en la Figura 4.81, con el fin de justificar la elección del mejor potencial para realizar las medidas amperométricas. Como se pudo observar, en ausencia de H_2O_2 no hay respuesta amperométrica ante los agregados de EUG.

En conclusión, se puede expresar que, para el caso del biosensor de H_2O_2 , en ausencia de EPS, no hay respuesta amperométrica, por lo tanto no estaría desarrollándose la reacción enzimática. Las NPsAu ayudarían a mejorar la transferencia electrónica heterogénea.

En el caso del biosensor de EUG, tanto EPS como H_2O_2 son necesarios para lograr la respuesta del biosensor ante diferentes agregados de EUG.

Referencias bibliográficas

Adamson, A. W., *Physical Chemistry and Surfaces*, 5ta edición, Wiley, Nueva York, 1990.

Appell, M., D. F. Kendra, E. K. Kim, C. M. Maragos. “Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers as sorbents of monilifomin”, *Food Addit. Contam.* **24** (2007) 43-53.

Casero E., Parra-Alfambra A.M., Petit-Domínguez M.D., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C., *Electrochem. Commun.* **20** (2012) 63–66.

Díaz Nieto, C. H., A. M. Granero, J. C. Lopez, G. D. Pierini, G. J. Levin, H. Fernández, M. A. Zon, “Development of a third generation biosensor to determine hydrogen peroxide on a composite of soyben peroxidase/chemically reduced graphene oxide deposited on glassy carbon electrodes”, *Sens. Act. B* **263** (2018) 377–386.

Freundlich, H. *Colloid and Capillary Chemistry*, Methuen, London, 1926

G. Yildiz, Z. Aydogmus, M. E. Cinar, F. Senkal, T. Ozturk, “Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis”, *Talanta* **173** (2017) 1-8.

Guo, Y., S. Guo, J. Li, E. Wang, S. Dong, “Cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim”, *Talanta* **84** (2011) 60–64.

Guo, Y., S. Guo, J. Ren, Y. Zhai, S. Dong, E. Wang, “Cyclodextrin functionalized graphene nanosheets with high supramolecular recognition capability: synthesis and host-guest inclusion for enhanced electrochemical performance”, *ACS NANO* **4** (2010) 4001-4010.

Kaffash, A., K. Rostami, H. R. Zare, “Modeling of an electrochemical nanobiosensor in COMSOL Multiphysics to determine phenol in the presence of horseradish peroxidase”, *Enzyme Microb. Technol.* **121** (2019) 23–28.

Kortüm, G., K. Andrussow, "Dissociation constants of organic acids in aqueous solution", Butterworths, 1961.

Laviron E., "General expression of the linear sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems", *J. Electroanal. Chem.* **101** (1979) 19-28.

Lin, X., Y. Ni, S. Kokot, "Electrochemical mechanism of eugenol at a Cu doped gold nanoparticles modified glassy carbon electrode and its analytical application in food samples", *Electrochim. Acta* **133** (2014) 484–491.

Lu, L.M., X-L. Qiu, X-B. Zhang, G-L. Shen, W. Tan, R-Q Yu, "Supramolecular assembly of enzyme on functionalized graphene for electrochemical biosensing", *Biosens. Bioelectron.* **45** (2013) 102–107.

M. Pumera, "Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids", *Electrochem. Commun.* **36** (2013) 14–18.

Marchiando, N. C., M. A. Zon, H. Fernandez, "Characterization of the Surface Redox Process of Adsorbed Cercosporin (CER) at Glassy Carbon Electrodes by Anodic Stripping Square-Wave Voltammetry", *Electroanalysis* **15** (2003) 40-48.

Markowitz, K., M. Moynihan, M. Liu, S. Kim, "Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol", *Oral surg. oral med. oral pathol.* **73** (1992) 729-37.

McMurray, J. *Organic chemistry* (8th ed.). California, USA: Brooks/Cole Publishing Company, 2010.

Molina, P. G., M. A. Zón, H. Fernandez, "The Redox Kinetics of Adsorbed ATX-I at Carbon Electrodes by Anodic Stripping Square-Wave Voltammetry", *Electroanalysis* **12** (2000) 791-798.

Morrison, R. T., R. N. Boyd. *Química Orgánica*, Adison Wesley de México S.A, México, 1998.

Nissum, M., Schiødt, C. B., & Welinder, K. G, “Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4-12.0, and veratryl alcohol at pH 2.4”, *Biochim. Biophys. Acta* **1545** (2001) 339–348.

Olivieri, A., H. Goicoechea, “La calibración en Química Analítica”, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, 2007.

Robledo, S. N., J. C. Lopez, A. M. Granero, M. A. Zensich, G. M. Morales, H. Fernandez, M.A. Zon, “Characterization of the surface redox process of caffeic acid adsorbed at glassy carbon electrodes modified with partially reduced graphene oxide”, *J. of Electroanal. Chem.* **783** (258-267).

Saglam, O., D. G. Dilgin, B. Ertek, Y. Dilgin, “Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode”, *Mater. Sci. Eng. C* **60** (2016) 156–162.

Thompson D., Norbeck, L-I Olsson, D. Constantin-Teodosiu, J. Van Der Zee, P. Moldeus, “Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite (s)”, *The J. Biol. Chem.* **264** (1989) 1016-1021.

CAPÍTULO 5: Conclusiones

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se llevó a cabo el estudio electroquímico de los antioxidantes EUG, IEUG y VAI sobre diferentes superficies: ECV, ECV/OG y ECV/OGPRE. Los tres compuestos son susceptibles de ser oxidados sobre las tres superficies. Para la obtención del electrodo modificado ECV/OGPRE, se llevó a cabo la reducción electroquímica del OG, a través del uso de VC. Se depositaron 10 μL de la dispersión de OG en agua sobre el ECV y, posterior al secado del mismo, se registraron 30 barridos catódicos en una ventana de potencial desde 0,1 V a -1,7 V vs Ag/AgCl, a una velocidad de barrido de 0,052 V s^{-1} en una 0,2 M SRF pH 7,00. Estas condiciones de reducción se obtuvieron a partir de la optimización del sistema, utilizando un diseño experimental del tipo Box-Behnken. En el caso del ECV-OG, simplemente, se depositó la gota de dispersión de OG sobre la superficie del ECV.

Para EUG, IEUG y VAI se seleccionó como mejor medio de reacción a 1 M HClO_4 y sobre éste se realizó un estudio, en mayor profundidad, acerca del mecanismo de reacción electroquímica de los antioxidantes.

EUG, presenta en el primer barrido cíclico de potencial, un pico de oxidación principal (Pico I) y un pico de reducción (Pico IIc) cuando se invierte la dirección del barrido de potencial (se considera que este pico no sería el pico complementario del pico de oxidación principal y que existiría una complicación cinética acoplada a la transferencia de carga inicial). Cuando se procede a realizar un segundo barrido cíclico aparece un nuevo pico anódico (IIa) a potenciales más bajos que el pico de oxidación I. Si los barridos cíclicos continúan, el pico I disminuye en intensidad, mientras que los picos IIa y IIc aumentan, quedando definido el par redox quasi-reversible IIa/IIc.

IEUG presenta sobre el ECV/OGPRE dos picos de oxidación (picos III y I, a menor y mayor potencial anódico, respectivamente) y un pico de reducción (pico IIc), durante el primer barrido cíclico de potencial. En barridos cíclicos posteriores, el pico III desaparece, mientras que surge un nuevo pico de oxidación (IIa) y el pico I decrece en intensidad de corriente. A continuación, queda claramente definido un par redox quasi-reversible (IIa/IIc) a potenciales menos anódicos que el pico I. Con respecto a los dos picos de oxidación observados en el primer barrido anódico de potencial, es posible proponer que el pico III se trataría de un pre-pico que indica que el producto de la oxidación electroquímica está más fuertemente adsorbido que el reactivo.

VAI presenta, durante el primer barrido anódico de potencial, un pico de oxidación principal (Pico I). Cuando se invierte la dirección del barrido de potencial, se observa un pico de reducción (Pico IIc). En los barridos cíclicos consecutivos, se observa la aparición de un nuevo pico anódico (Pico IIa), acompañado de una disminución de la intensidad del pico I. Así, queda definido un par redox quasi-reversible (IIa/IIc) a potenciales menos anódicos que el pico I.

En cuanto a la comparación de la respuesta electroquímica de los antioxidantes sobre el ECV/OGPRE y con especial atención al pico I, EUG se oxida a potenciales menos anódicos respecto a IEUG. Mientras tanto, de los tres antioxidantes, VAI es la que presenta el pico I a potenciales más anódicos. Este comportamiento puede ser explicado considerando que VAI posee en su estructura molecular un grupo atractor de electrones, que desestabilizaría el correspondiente catión radical formado en la primer etapa del proceso de oxidación.

Se calculó, mediante métodos teóricos, los valores de los ΔG_{rel}^o de formación de los posibles productos electroquímicos, generados durante el primer barrido anódico de potencial. En el caso de EUG no existe, prácticamente, diferencia entre los valores obtenidos para P1 y P2, lo que indicaría que ambos productos pueden formarse. Para IEUG, hay una diferencia de $9,46 \text{ kcal mol}^{-1}$, indicando que la 4-propenil-1,2-diquinona sería más factible de ser formada, al igual que para la VAI donde la probabilidad de formar la metilen quinona (P2) no es factible. De todas formas, el par redox IIa/IIc resultaría de la oxidación/reducción de la correspondiente diquinona.

En cuanto al par redox quasi-reversible IIa/IIc (PO) se calcularon $(1 - \alpha)$ y k_s de cada uno de los tres sustratos. Se obtuvieron valores de k_s de 2,62, 3,7 y $4,8 \text{ s}^{-1}$ para EUG, IEUG y VAI, respectivamente, y valores para $(1 - \alpha)$ de 0,41, 0,46 y 0,32 para EUG, IEUG y VAI, respectivamente.

Sobre el ECV/OGPRE, la oxidación electroquímica de EUG en 1 M HClO_4 presenta, predominantemente, un control adsorptivo, por lo que se procedió a determinar qué modelo de isoterma de adsorción es el que mejor describe la interacción entre EUG y el ECV/OGPRE. La mejor isoterma de adsorción que describe el fenómeno es la de Freundlich, de base empírica, donde se obtuvo un valor de β de 14 ± 4 y un valor de n de

$0,51 \pm 0,05$. A partir de la dependencia de la adsorción con la temperatura, se determinó que, a medida que la temperatura aumenta, se incrementa la cantidad de EUG adsorbido. Esto sería consecuencia de que el proceso de adsorción es endotérmico ($\Delta H_{ads} < 0$).

Por otro lado, si se comparan las respuestas electroquímicas de los antioxidantes sobre los tres tipos de electrodos utilizados, existe un marcado incremento en $I_{p,a}$ cuando la descarga electroquímica ocurre sobre el ECV/OGPRE, lo que pone de manifiesto un aumento en la sensibilidad debido a la recuperación de la conductividad eléctrica del material tras la reducción electroquímica del OG. Asimismo, se observa un corrimiento hacia potenciales menos anódicos para $E_{p,a}$ sobre el ECV/OGPRE. Al no ser significativas las diferencias en los valores de J y A_e entre el ECV y el ECV/OGPRE, existe un fenómeno de electrocatálisis por parte del OGPRE, que genera el corrimiento en el $E_{p,a}$ anteriormente descrito.

En el caso del ECV/OG, ocurre una disminución de $I_{p,a}$. El OG es considerado una película aislante, que bloquea la transferencia electrónica en la interfaz electrodo-solución. Este comportamiento se explica por los grupos funcionales oxigenados, que determinan la pérdida de movilidad de los electrones de conducción.

También, se determinó el valor de pKa para EUG, IEUG y VAI a partir de medidas espectrofotométricas, utilizando el algoritmo MCR-ALS, obteniéndose un valor de 9,2 ($K_a = 6,3 \times 10^{-11}$), 10,2 ($K_a = 5,8 \times 10^{-11}$) y 6,9 ($K_a = 1,2 \times 10^{-7}$), para los pKa de EUG, IEUG y VAI, respectivamente. Así, se pudo determinar que, de los tres antioxidantes estudiados, VAI es el más ácido. Este comportamiento puede ser explicado considerando que el grupo aldehído, que posee VAI en su estructura molecular, es un sustituyente atractor de electrones, por lo cual el anión RO^- , generado por la pérdida de un H^+ , queda estabilizado por resonancia. Por otra parte, los grupos metoxi, alílicos y propenilicos son dadores de electrones por resonancia y por hiperconjugación. Esto permite explicar por qué EUG e IEUG son menos ácidos que el fenol y a la vez poseen valores similares de K_a^{AP} entre ellos.

Las medidas experimentales destinadas a estudiar la cinética de la reacción enzimática entre la enzima EPS y EUG, IEUG y VAI, respectivamente, mostraron que los tres son co-sustratos de dicha enzima. Mediante las herramientas quimiométricas de diseño experimental y el algoritmo MCR-ALS se obtuvieron las mejores condiciones (pH

del medio de reacción, c_{CO-S}^* , $c_{H_2O_2}^*$ y c_{ENZ}^*) en que pueden ser llevadas a cabo las reacciones enzimáticas, en la región experimental estudiada. Además, se calcularon los valores de k_1 y k_3 para cada uno de los tres antioxidantes.

Así, las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción enzimática, bajo las condiciones experimentales estudiadas, para EUG fueron: $c_{EUG}^* = 387 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 1131 \mu M$. No existieron interacciones entre los cuatro factores estudiados. Para IEUG: $c_{IEUG}^* = 39 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 1112 \mu M$, $c_{EPS}^* = 0,040 \mu M$ y $pH = 8$. Las interacciones entre factores fueron las siguientes: $c_{EPS}^* - pH$ y $c_{EPS}^* - c_{H_2O_2}^*$. Para VAI: $c_{VAI}^* = 63 \mu M$, $c_{H_2O_2}^* = 17 \mu M$, $c_{EPS}^* = 0,040 \mu M$ y $pH = 5,2$. También, se encontraron las siguientes interacciones entre los factores: $c_{VAI}^* - c_{EPS}^*$, $c_{VAI}^* - c_{H_2O_2}^*$ y $c_{VAI}^* - pH$. Las constantes de velocidad del ciclo catalítico de las peroxidasas para cada uno de los co-sustratos fueron: $k_1 = (0,6 \pm 0,1) \times 10^5$ y $k_3 = (4,0 \pm 0,2) \times 10^5$ para EUG a $pH 7$, $k_1 = (20 \pm 2) \times 10^4$ y $k_3 = (60 \pm 6) \times 10^4$ para IEUG a $pH 8$ y $k_1 = (70 \pm 5) \times 10^5$ y $k_3 = (60 \pm 9) \times 10^5$ para VAI a $pH 5,2$

También, se calcularon los valores K_M^{AP} para cada uno de los antioxidantes. Como era de esperar, K_M^{AP} depende de $c_{H_2O_2}^*$. EUG es mejor co-sustrato de la EPS que IEUG, bajo condiciones experimentales similares. Al analizar los valores de K_M^{AP} para VAI, ésta sería el mejor co-sustrato (de los tres analizados) para EPS. VAI fue el único antioxidante donde el pH resultó ser un factor significativo para determinar v_i . Además, el mejor valor de $c_{H_2O_2}^*$ para VAI fue mucho menor que para EUG e IEUG.

En lo que respecta a las medidas electroanalíticas, se desarrolló un biosensor enzimático amperométrico, basado en la inmovilización de un conjugado EPS-ADA sobre un ECV modificado con el compuesto OGRQ- β CD. Sobre el electrodo modificado se generaron, NPsAu, las que contribuirían a mejorar la transferencia electrónica heterogénea.

Se caracterizaron por medidas de espectroscopía UV-Visible tanto la síntesis del compuesto OGRQ- β CD como la del conjugado EPS-ADA. Además, mediante imágenes SEM, EIE y VC, se caracterizaron las diferentes etapas del armado del biosensor.

En primer lugar, la búsqueda de las mejores condiciones del armado del biosensor se dirigió a la determinación de H_2O_2 . Con esta molécula como analito de interés, se encontró, por medio de un DFF, que los factores que resultan ser significativos (para el

armado del biosensor) son: el volumen del compuesto OGRQ- β CD a depositar sobre la superficie del ECV, el potencial de electrodeposición de las NPsAu y el E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H_2O_2 . En la etapa de optimización, mediante un diseño DCC, se determinó, mediante estos tres factores y el pH al que se realizan las medidas amperométricas, las mejores condiciones del armado del biosensor. Éstas son:

- Volumen del compuesto OGRQ- β CD a depositar sobre el ECV: 8,8 μ L
- Potencial de electrodeposición de las NPAus: -0,220 V vs Ag/AgCl.
- E_a al ET durante la estabilización y los agregados de H_2O_2 : - 0,090 V vs Ag/AgCl.
- pH al que se realizan las medidas amperométricas: 6,33

El intervalo lineal del biosensor está entre 4×10^{-4} M y 1×10^{-3} M. La sensibilidad es de $(3,10 \pm 0,09) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. El LOD es 1×10^{-4} M y el LOQ es 4×10^{-4} M. La K_M^{AP} es de $(2,7 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ M. La reproducibilidad fue del 8 %. La repetibilidad fue del 3 %. El biosensor se conservó a 4 °C en 0,2 M SRF pH 7, mientras no se usó. En cuanto a la estabilidad, a partir del día 24 se observó una disminución de la sensibilidad del 23 %.

En cuanto al biosensor para la determinación de EUG, en la etapa de selección de factores se encontró que los factores significativos para el armado de dicho biosensor son: el potencial de electrodeposición de las NPsAu, el tiempo de electrodeposición de las NPsAu, el tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base), el E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG y la $c_{H_2O_2}^*$. Durante la etapa de optimización, se determinó que las mejores condiciones de armado del biosensor son las siguientes:

- Potencial de electrodeposición de las NPsAu: - 0,250 V
- Tiempo de electrodeposición de las NPsAu: 20,49 s
- Tiempo de estabilización del biosensor en la solución reguladora correspondiente (obtención de la línea de base): 12,09 min
- E_a al ET durante la estabilización y los agregados de EUG: 0 V
- $c_{H_2O_2}^*$: 1×10^{-4} M

El mejor E_a al ET durante las medidas amperométricas se relaciona con la reducción electroquímica reversible de la 4-allil-quinona (producto de la oxidación enzimática de EUG) a 4-allil-catecol.

El intervalo lineal de este biosensor está entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-5} M. La sensibilidad es de $(7,4 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ A M⁻¹. El LOD es $3,1 \times 10^{-8}$ M y el LOQ es 1×10^{-7} M. La reproducibilidad fue del 8 %. La repetibilidad fue del 3 %. En cuanto a la estabilidad del biosensor es posible mencionar que la sensibilidad se mantuvo constante durante 15 días. Luego, la sensibilidad disminuyó un 30 %.

Este biosensor, además, se aplicó para la determinación de EUG en dos muestras reales de uso odontológico: “Cemento de restauración intermedia” y “Dentolina Fucus”. Para la primera se probó el biosensor utilizando, únicamente, el líquido del cual estaba provista la muestra y, también, a partir de una pasta formada por el mencionado líquido y ZnO. Para ambos casos, los porcentajes de recuperación fueron satisfactorios. Para la segunda muestra, también se obtuvieron porcentajes de recuperación satisfactorios y se pudo probar que, bajo las condiciones trabajadas, GUA (uno de los componentes de la muestra) no interfiere en la determinación de EUG, debido a que el biosensor presenta un tiempo de respuesta considerablemente mayor ante este interferente.

