

**DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMB ENZIMS OXIDOREDUCTASES
BASATS EN TRANSDUCTORS AMPEROMÈTRICS MODIFICATS
QUÍMICAMENT**

MEMÒRIA PRESENTADA PER
BEATRIU PRIETO SIMÓN
PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES QUÍMIQUES



Bellaterra, maig de 2005

Aquesta tesi doctoral, que porta per títol "Desenvolupament de biosensors amb enzims oxidoreductases basats en transductors amperomètrics modificats químicament", ha estat realitzada als laboratoris del Grup de Sensors i Biosensors del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, per Beatriu Prieto Simón, sota la direcció del Dr. Esteve Fàbregas i Martínez.

Bellaterra, maig de 2005

Esteve Fàbregas
Professor titular d'universitat

La present tesi doctoral va ésser defensada públicament a la Universitat Autònoma de Barcelona el dia 28 de juliol de 2005.

El tribunal va ser constituït pels següents membres:

President:

Dr. Salvador Alegret i Sanromà, catedràtic d'universitat, Universitat Autònoma de Barcelona.

Vocal 1:

Dr. Jean-Louis Marty, catedràtic d'universitat, Université de Perpignan.

Vocal 2:

Dr. Santiago Hernández Cassou, professor titular, Universitat de Barcelona.

Vocal 3:

Dr. Juan Casado Giménez, investigador, consorci format per la Universitat Autònoma de Barcelona i MATGAS.

Secretari:

Dr. Arben Merkoçi, investigador, Universitat Autònoma de Barcelona.

Grup de Sensors & Biosensors
Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona
Edifici Cn. 08193 Bellaterra
Tel: +34 93 581 21 18. Fax: +34 93 581 23 79

El treball descrit en aquesta memòria s'ha pogut dur a terme gràcies als següents estalons institucionals:

Fundación Centro de Estudios e Investigaciones del Agua (CEIA) i ADASA Sistemas S.A. (Grupo AGBAR). Projecte: "Desarrollo y evaluación de bioanalizadores de efluentes industriales".

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid.

Projecte: "Desarrollo de biosensores y bioinstrumentación analítica basados en materiales compuestos". BIO096-0740

Projecte: "Desarrollo de biosensores de afinidad y bioinstrumentación analítica basada en especies inmunológicas y ácidos nucleicos, para su aplicación en análisis clínicos, ambientales y alimentarios". BIO099-0751

Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid.

Projecte: "Aplicación de nuevos materiales compuestos a la construcción de biosensores electroquímicos compactos". MAT2003-01253

Generalitat de Catalunya. Pla de Recerca de Catalunya. Ajut per a potenciar Grups de Recerca Consolidats. 1997SGR00037

Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.

Per la concessió d'una beca de Formación de Personal Investigador (FPI). Ref.:AP98

Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Madrid.

Per la concessió de dos ajuts per a estades breus a l'estranger per a becaris predoctorals del Programa de Formació de Professorat Universitari:

- De juny de 2001 a gener de 2002, al centre AgResearch (Palmerston North, Nova Zelanda).

- De juny de 2002 a gener de 2003, a la universitat de Ioànnina (Ioànnina, Grècia).

Part del treball descrit en aquesta memòria ha donat lloc a les següents publicacions:

Comparative study of electron mediators used in the electrochemical oxidation of NADH. Beatriu Prieto-Simón, Esteve Fàbregas. *Biosensors & Bioelectronics*, **19** (2004) 1131-1138

Metal-dispersed xerogel-based composite films for the development of interference free oxidase-based biosensors. Beatriz Prieto-Simón, Gerasimos S. Armatas, Philippos J. Pomonis, Christos G. Nanos, Mamas I. Prodromidis. *Chemistry of Materials*, **16** (2004) 1026-1034

New redox-mediator modified polysulfone composite films for the development of dehydrogenase-based biosensors. Beatriz Prieto-Simón, Esteve Fàbregas. (enviat)

ÍNDEX

| | |
|---|-----|
| <i>ABREVIATURES</i> | xxv |
| 1 INTRODUCCIÓ | |
| 1.1 SENSORS | 1 |
| 1.1.1 <i>TRANSDUCCIÓ</i> | 2 |
| 1.1.1.1 Dispositius potenciomètrics | 4 |
| 1.1.1.2 Dispositius amperomètrics | 6 |
| 1.1.2 <i>RECOINEIXEMENT SELECTIU</i> | 9 |
| 1.1.2.1 Enzims | 11 |
| 1.1.2.2 Anticossos i antigens | 12 |
| 1.1.2.3 Oligonucleòtids | 12 |
| 1.1.2.4 Receptors químics | 13 |
| 1.2 BIOSENSORS ENZIMÀTICS | 13 |
| 1.2.1 <i>ESTRATÈGIES D'ÚS DELS BIOSENSORS ENZIMÀTICS</i> | 15 |
| 1.2.1.1 Determinació d'analits mitjançant la mesura de l'activitat catalítica | 16 |
| 1.2.1.2 Determinació de l'enzim com a analit | 19 |
| 1.2.2 <i>ESTRATÈGIES D'IMMOBILITZACIÓ</i> | 19 |
| 1.2.3 <i>SEQÜENCIACIÓ DE REACCIONS ENZIMÀTIQUES</i> | 25 |
| 1.3 MODIFICACIÓ QUÍMICA DE SENSORS ELECTROQUÍMICS | 26 |
| 1.3.1 <i>OBJECTIUS DE LES MODIFICACIONS QUÍMIQUES</i> | 27 |
| 1.3.1.1 Preconcentració | 28 |
| 1.3.1.2 Permeabilitat selectiva | 29 |
| 1.3.1.3 Electrocatàlisi | 30 |
| 1.3.2 <i>ESTRATÈGIES D'INCORPORACIÓ DE MODIFICADORS A LA CONFIGURACIÓ D'UN SENSOR</i> | 34 |
| 1.3.2.1 Modificadors en solució | 34 |
| 1.3.2.2 Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar monocapes | 35 |
| 1.3.2.3 Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar pel·lícules polimèriques | 37 |
| 1.4 AUTOMATITZACIÓ DEL PROCÉS ANALÍTIC | 39 |
| 1.5 SITUACIÓ ACTUAL DELS BIOSENSORS | 42 |
| 1.6 OBJECTIUS | 43 |
| 1.7 BIBLIOGRAFIA | 46 |

**PART I. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE SENSORS AMPEROMÈTRICS
MODIFICATS QUÍMICAMENT**

| | | |
|----------|---|----|
| 2 | ESTUDI DEL COMPORTAMENT DE TRANSDUCTORS EMPRATS EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH | |
| 2.1 | INTRODUCCIÓ | 53 |
| 2.2 | EXPERIMENTAL | 56 |
| 2.2.1 | APARELLS I REACTIUS | 56 |
| 2.2.1.1 | Aparells | 56 |
| 2.2.1.2 | Reactius | 57 |
| 2.2.2 | ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE PLATÍ EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH | 57 |
| 2.2.2.1 | Construcció d'un transductor de platí de configuració plana | 58 |
| 2.2.2.2 | Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD ⁺ sobre la superfície d'un transductor de platí | 59 |
| 2.2.2.3 | Estudi de la passivació del transductor de platí durant el procés d'oxidació de NADH a NAD ⁺ | 59 |
| 2.2.2.4 | Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de platí | 60 |
| 2.2.3 | ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE GRAFIT-EPOXI EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH | 60 |
| 2.2.3.1 | Construcció d'un transductor basat en un compost de grafit-epoxi | 61 |
| 2.2.3.2 | Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD ⁺ sobre la superfície d'un transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi | 63 |
| 2.2.3.3 | Estudi de la passivació del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi durant el procés d'oxidació de NADH a NAD ⁺ | 63 |
| 2.2.3.4 | Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi | 64 |
| 2.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 64 |
| 2.3.1 | ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE PLATÍ EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH | 64 |
| 2.3.1.1 | Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD ⁺ sobre la superfície d'un transductor de platí | 65 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.3.1.2 | Estudi de la passivació del transductor de platí durant el procés d'oxidació de NADH a NAD ⁺ | 65 |
| 2.3.1.3 | Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de platí | 66 |
| 2.3.2 | <i>ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE GRAFIT-EPOXI EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH</i> | 68 |
| 2.3.2.1 | Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD ⁺ sobre la superfície d'un transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi | 68 |
| 2.3.2.2 | Estudi de la passivació del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi durant el procés d'oxidació de NADH a NAD ⁺ | 69 |
| 2.3.2.3 | Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi | 70 |
| 2.4 | CONCLUSIONS | 75 |
| 2.5 | BIBLIOGRAFIA | 77 |
| 3 | REGENERACIÓ DE LA SUPERFÍCIE PASSIVADA DEL TRANSDUCTOR UTILITZAT EN EL PROCÉS D'OXIDACIÓ DE NADH A NAD⁺ | |
| 3.1 | INTRODUCCIÓ | 79 |
| 3.2 | EXPERIMENTAL | 81 |
| 3.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 81 |
| 3.2.1.1 | Aparells | 81 |
| 3.2.1.2 | Reactius | 81 |
| 3.2.2 | <i>PREVENCIÓ DE LA PASSIVACIÓ</i> | 82 |
| 3.2.2.1 | Viabilitat de treballar amb un amperímetre de corrent altern | 82 |
| 3.2.2.2 | Aplicació de monocapes denses de poliamida | 82 |
| 3.2.2.3 | Electrocatalisi | 83 |
| 3.2.3 | <i>REGENERACIÓ DE SUPERFÍCIES PASSIVADES</i> | 84 |
| 3.2.3.1 | Regeneració mecànica basada en el poliment físic dels transductors de grafit-epoxi | 84 |
| 3.2.3.2 | Regeneració electroquímica de la superfície dels transductors de platí | 84 |
| 3.2.3.2.1 | <i>Aplicació de potencials extrems d'oxidació i/o reducció</i> | 84 |
| 3.2.3.2.2 | <i>Curtcircuit entre els elèctrodes de treball i auxiliar</i> | 85 |
| 3.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 86 |
| 3.3.1 | <i>PREVENCIÓ DE LA PASSIVACIÓ</i> | 86 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.3.1.1 | Viabilitat de treballar amb un amperímetre de corrent altern | 86 |
| 3.3.1.2 | Aplicació de monocapes denses de poliamida | 87 |
| 3.3.2 | <i>REGENERACIÓ DE SUPERFÍCIES PASSIVADES</i> | 88 |
| 3.3.2.1 | Regeneració mecànica basada en el polímer físic dels transductors de grafit-epoxi | 88 |
| 3.3.2.2 | Regeneració electroquímica de la superfície dels transductors de platí | 89 |
| 3.3.2.2.1 | <i>Aplicació de potencials extrems d'oxidació i/o reducció</i> | 89 |
| 3.3.2.2.2 | <i>Curtcircuit entre els elèctrodes de treball i auxiliar</i> | 91 |
| 3.4 | CONCLUSIONS | 92 |
| 3.5 | BIBLIOGRAFIA | 94 |
| 4 | DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH: ESTUDI COMPARATIU DE DIFERENTS METODOLOGIES D'INCORPORACIÓ DE DIVERSOS MEDIADORS REDOX AL SISTEMA DE DETECCIÓ | |
| 4.1 | INTRODUCCIÓ | 95 |
| 4.2 | EXPERIMENTAL | 98 |
| 4.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 98 |
| 4.2.1.1 | Aparells | 98 |
| 4.2.1.2 | Reactius | 98 |
| 4.2.2 | <i>ESTUDI DELS PROCESSOS D'OXIDACIÓ I REDUCCIÓ DELS MEDIADORS SELECCIONATS</i> | 98 |
| 4.2.2.1 | Caracterització electroquímica | 99 |
| 4.2.2.2 | Avaluació de la resposta | 99 |
| 4.2.3 | <i>SISTEMES QUIMIOSENSORS AMB INCORPORACIÓ DE MEDIADORS EN SOLUCIÓ</i> | 100 |
| 4.2.3.1 | Reducció de NAD ⁺ a NADH | 100 |
| 4.2.3.2 | Oxidació de NADH a NAD ⁺ | 100 |
| 4.2.4 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS QUE CONTENEN MEDIADOR AL SEU INTERIOR</i> | 100 |
| 4.2.4.1 | Preparació dels compòsits | 100 |
| 4.2.4.2 | Caracterització electroquímica | 101 |
| 4.2.4.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 101 |
| 4.2.5 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 102 |
| 4.2.5.1 | Adsorció del mediador | 103 |
| 4.2.5.2 | Caracterització electroquímica | 103 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.2.5.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 103 |
| 4.2.6 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT EN MEMBRANES DE NAFIÓ DIPOSITADES SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 103 |
| 4.2.6.1 | Preparació de les membranes de Nafió amb mediador adsorbit | 104 |
| 4.2.6.2 | Caracterització electroquímica | 104 |
| 4.2.6.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 104 |
| 4.2.7 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 105 |
| 4.2.7.1 | Electropolimerització del mediador | 105 |
| 4.2.7.2 | Caracterització electroquímica | 105 |
| 4.2.7.3 | Optimització del procés d'electropolimerització | 105 |
| 4.2.7.4 | Avaluació de la resposta a NADH | 106 |
| 4.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 106 |
| 4.3.1 | <i>ESTUDI DELS PROCESSOS D'OXIDACIÓ I REDUCCIÓ DELS MEDIADORS SELECCIONATS</i> | 106 |
| 4.3.1.1 | Caracterització electroquímica | 106 |
| 4.3.1.2 | Avaluació de la resposta | 108 |
| 4.3.2 | <i>SISTEMES QUIMIOSENSORS AMB INCORPORACIÓ DE MEDIADORS EN SOLUCIÓ</i> | 111 |
| 4.3.2.1 | Reducció de NAD ⁺ a NADH | 111 |
| 4.3.2.2 | Oxidació de NADH a NAD ⁺ | 112 |
| 4.3.3 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS QUE CONTENEN MEDIADOR AL SEU INTERIOR</i> | 114 |
| 4.3.3.1 | Preparació dels compòsits | 114 |
| 4.3.3.2 | Caracterització electroquímica | 114 |
| 4.3.3.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 115 |
| 4.3.4 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 120 |
| 4.3.4.1 | Caracterització electroquímica | 120 |
| 4.3.4.2 | Avaluació de la resposta a NADH | 121 |
| 4.3.5 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT EN MEMBRANES DE NAFIÓ DIPOSITADES SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 123 |
| 4.3.5.1 | Preparació de les membranes de Nafió amb mediador adsorbit | 123 |
| 4.3.5.2 | Caracterització electroquímica | 123 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.3.5.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 124 |
| 4.3.6 | <i>QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 125 |
| 4.3.6.1 | Electropolimerització del mediador | 125 |
| 4.3.6.2 | Caracterització electroquímica i optimització del procés d'electropolimerització | 125 |
| 4.3.6.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 128 |
| 4.3.7 | <i>JUSTIFICACIÓ DEL COMPORTAMENT DELS MEDIADORS ESTUDIATS</i> | 129 |
| 4.4 | CONCLUSIONS | 132 |
| 4.5 | BIBLIOGRAFIA | 136 |
| 5 | DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH: ÚS DE MEMBRANES DE POLISULFONA PER A LA INCORPORACIÓ DE DIVERSOS MEDIADORS REDOX AL SISTEMA DE DETECCIÓ | |
| 5.1 | INTRODUCCIÓ | 139 |
| 5.2 | EXPERIMENTAL | 140 |
| 5.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 140 |
| 5.2.1.1 | Aparells | 140 |
| 5.2.1.2 | Reactius | 141 |
| 5.2.2 | <i>VALIDACIÓ DE LES MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA COM A NOUS MATERIALS TRANSDUCTORS PER AL DESENVOLUPAMENT DE SENSORS ELECTROQUÍMICS</i> | 141 |
| 5.2.2.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona | 142 |
| 5.2.2.2 | Caracterització electroquímica | 143 |
| 5.2.2.3 | Avaluació de la resposta a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ | 143 |
| 5.2.3 | <i>OPTIMITZACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MB PER AL DESENVOLUPAMENT D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH</i> | 143 |
| 5.2.3.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 143 |
| 5.2.3.2 | Caracterització electroquímica | 144 |
| 5.2.3.2.1 | <i>Estudis voltamperomètrics</i> | 144 |
| 5.2.3.2.2 | <i>Estudis amperomètrics</i> | 144 |
| 5.2.3.3 | Espectroscòpia d'impedàncies | 144 |
| 5.2.3.4 | Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat | 145 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 5.2.3.5 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 145 |
| 5.2.4 | <i>AVALUACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB DIFERENTS MEDIADORS REDOX I SELECCIÓ DE L'ELÈCTRODE MÉS EFICIENT COM A QUIMIOSENSOR PER A NADH</i> | 146 |
| 5.2.4.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb diferents mediadors redox | 147 |
| 5.2.4.2 | Caracterització electroquímica | 147 |
| 5.2.4.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 147 |
| 5.2.4.4 | Estabilitat i reproductibilitat dels elèctrodes preparats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 147 |
| 5.2.4.5 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 148 |
| 5.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 148 |
| 5.3.1 | <i>VALIDACIÓ DE LES MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA COM A NOUS MATERIALS TRANSDUCTORS PER AL DESENVOLUPAMENT DE SENSORS ELECTROQUÍMICS</i> | 148 |
| 5.3.1.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona | 148 |
| 5.3.1.2 | Caracterització electroquímica | 149 |
| 5.3.1.3 | Avaluació de la resposta a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ | 150 |
| 5.3.2 | <i>OPTIMITZACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MB PER AL DESENVOLUPAMENT D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH</i> | 151 |
| 5.3.2.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 151 |
| 5.3.2.2 | Caracterització electroquímica | 151 |
| 5.3.2.2.1 | <i>Estudis voltamperomètrics</i> | 152 |
| 5.3.2.2.2 | <i>Estudis amperomètrics</i> | 152 |
| 5.3.2.3 | Espectroscòpia d'impedàncies | 154 |
| 5.3.2.4 | Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat | 156 |
| 5.3.2.5 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 159 |
| 5.3.3 | <i>AVALUACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB DIFERENTS MEDIADORS REDOX I SELECCIÓ DE L'ELÈCTRODE MÉS EFICIENT COM A QUIMIOSENSOR PER A NADH</i> | 161 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.3.3.1 | Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb diferents mediadors redox | 161 |
| 5.3.3.2 | Caracterització electroquímica | 161 |
| 5.3.3.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 162 |
| 5.3.3.4 | Estabilitat i reproductibilitat dels elèctrodes preparats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 164 |
| 5.3.3.5 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB | 165 |
| 5.4 | CONCLUSIONS | 167 |
| 5.5 | BIBLIOGRAFIA | 169 |
| 6 | DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂: ÚS DE COMPÒSITS BASATS EN XEROGELS AMB METALLS DISPERSOS | |
| 6.1 | INTRODUCCIÓ | 171 |
| 6.2 | EXPERIMENTAL | 175 |
| 6.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 175 |
| 6.2.1.1 | Aparells | 175 |
| 6.2.1.2 | Reactius | 175 |
| 6.2.2 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN HIDROGELS DE SÍLICE AMB METALLS</i> | 176 |
| 6.2.2.1 | Síntesi de gels de sílice modificats amb metalls | 177 |
| 6.2.2.2 | Preparació i avaluació de membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls | 177 |
| 6.2.2.3 | Caracterització electroquímica | 177 |
| 6.2.2.4 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls | 177 |
| 6.2.2.5 | Optimització del pH de la solució amortidora emprada | 177 |
| 6.2.3 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN QUIMIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂ BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS</i> | 178 |
| 6.2.3.1 | Preparació i caracterització electroquímica de membranes basades en compòsits de xerogels amb metalls | 178 |
| 6.2.3.2 | Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat i avaluació de la concentració de metalls | 179 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 6.2.3.3 | Isotermes d'absorció-desorció de N ₂ | 179 |
| 6.2.3.4 | Estudis termogravimètrics | 180 |
| 6.2.3.5 | Estudi dels coeficients de difusió | 180 |
| 6.2.3.6 | Espectroscòpia d'impedàncies | 180 |
| 6.2.3.7 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en composts de xerogels amb metalls | 181 |
| 6.2.3.8 | Optimització del pH de la solució amortidora emprada | 181 |
| 6.2.3.9 | Estudi de la resposta amperomètrica a H ₂ O ₂ | 181 |
| 6.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 182 |
| 6.3.1 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN HIDROGELS DE SÍLICE AMB METALLS</i> | 182 |
| 6.3.1.1 | Síntesi de gels de sílice modificats amb metalls | 182 |
| 6.3.1.2 | Preparació i avaluació de membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls | 183 |
| 6.3.1.3 | Caracterització electroquímica | 184 |
| 6.3.1.4 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls | 185 |
| 6.3.1.5 | Optimització del pH de la solució amortidora emprada | 186 |
| 6.3.2 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN QUIMIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂ BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS</i> | 188 |
| 6.3.2.1 | Preparació i caracterització electroquímica de membranes basades en composts de xerogels amb metalls | 188 |
| 6.3.2.2 | Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat | 189 |
| 6.3.2.3 | Isotermes d'absorció-desorció de N ₂ | 193 |
| 6.3.2.4 | Estudis termogravimètrics | 195 |
| 6.3.2.5 | Estudi dels coeficients de difusió | 195 |
| 6.3.2.6 | Espectroscòpia d'impedàncies | 197 |
| 6.3.2.7 | Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en composts de xerogels amb metalls | 198 |
| 6.3.2.8 | Optimització del pH de la solució amortidora emprada | 199 |
| 6.3.2.9 | Estudi de la resposta amperomètrica a H ₂ O ₂ | 201 |
| 6.3.2.10 | Justificació del caràcter catalític mostrat per cadascun dels xerogels avaluats | 202 |
| 6.4 | CONCLUSIONS | 204 |

**PART II. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS
MODIFICATS QUÍMICAMENT BASATS EN ENZIMS OXIDOREDUCTASES**

| | | |
|-----------|--|-----|
| 7 | DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS BASATS EN ENZIMS QUE ACTUEN COM A CATALITZADORS DE LA DETERMINACIÓ DE NADH O H₂O₂ MITJANÇANT DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA | |
| 7.1 | INTRODUCCIÓ | 213 |
| 7.2 | EXPERIMENTAL | 216 |
| 7.2.1 | APARELLS I REACTIUS | 216 |
| 7.2.1.1 | Aparells | 216 |
| 7.2.1.2 | Reactius | 217 |
| 7.2.2 | BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM DIAFORASA COM A CATALITZADOR DE L'OXIDACIÓ DE NADH MEDIATITZADA | 217 |
| 7.2.2.1 | Estudi de sistemes biosensors amb diaforasa en solució | 217 |
| 7.2.2.1.1 | Caracterització electroquímica | 217 |
| 7.2.2.1.2 | Avaluació de la resposta a NADH | 218 |
| 7.2.2.2 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa | 219 |
| 7.2.2.2.1 | Preparació dels biocompòsits amb diaforasa | 219 |
| 7.2.2.2.2 | Avaluació de la resposta a NADH | 219 |
| 7.2.2.3 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa i mediador | 219 |
| 7.2.2.3.1 | Preparació dels biocompòsits amb diaforasa i mediador | 220 |
| 7.2.2.3.2 | Caracterització electroquímica | 220 |
| 7.2.2.3.3 | Avaluació de la resposta a NADH | 220 |
| 7.2.2.4 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB | 220 |
| 7.2.2.4.1 | Preparació dels biocompòsits modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB | 220 |
| 7.2.2.4.2 | Avaluació de la resposta a NADH | 221 |
| 7.2.2.5 | Estudi de compòsits modificats amb mediador electropolimeritzat en presència de diaforasa | 221 |
| 7.2.2.5.1 | Electropolimerització del mediador en presència de diaforasa | 221 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 7.2.2.5.2 | <i>Avaluació de la resposta amperomètrica</i> | 222 |
| 7.2.2.6 | Estudi d'elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa | 222 |
| 7.2.2.6.1 | <i>Preparació dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa</i> | 223 |
| 7.2.2.6.2 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 223 |
| 7.2.2.6.3 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa</i> | 223 |
| 7.2.2.6.4 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 224 |
| 7.2.2.6.5 | <i>Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig</i> | 224 |
| 7.2.3 | BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM HRP COM A CATALITZADOR DE LA REDUCCIÓ DE PERÒXID D'HIDROGEN MEDIATITZADA | 224 |
| 7.2.3.1 | Estudi d'elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP | 224 |
| 7.2.3.1.1 | <i>Preparació dels elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP</i> | 224 |
| 7.2.3.1.2 | <i>Avaluació de la resposta a peròxid d'hidrogen</i> | 225 |
| 7.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 225 |
| 7.3.1 | BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM DIAFORASA COM A CATALITZADOR DE L'OXIDACIÓ DE NADH MEDIATITZADA | 225 |
| 7.3.1.1 | Estudi de sistemes biosensors amb diaforasa en solució | 225 |
| 7.3.1.1.1 | <i>Caracterització electroquímica</i> | 225 |
| 7.3.1.1.2 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 227 |
| 7.3.1.2 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa | 228 |
| 7.3.1.2.1 | <i>Preparació dels biocompòsits amb diaforasa</i> | 228 |
| 7.3.1.2.2 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 228 |
| 7.3.1.3 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa i mediador | 229 |
| 7.3.1.3.1 | <i>Preparació dels biocompòsits amb diaforasa i mediador</i> | 229 |
| 7.3.1.3.2 | <i>Caracterització electroquímica</i> | 229 |
| 7.3.1.3.3 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 230 |
| 7.3.1.4 | Estudi de biocompòsits amb diaforasa modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen MB | 231 |
| 7.3.1.4.1 | <i>Preparació dels biocompòsits modificats amb membranes basades en compòsits</i> | |

| | | |
|-----------|--|-----|
| | <i>de grafit-polisulfona que incorporen MB</i> | 231 |
| 7.3.1.4.2 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 232 |
| 7.3.1.5 | Estudi de compòsits modificats amb mediador electropolimeritzat en presència de diaforasa | 233 |
| 7.3.1.5.1 | <i>Electropolimerització del mediador en presència de diaforasa i avaluació de la resposta amperomètrica</i> | 233 |
| 7.3.1.6 | Estudi d'elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa | 235 |
| 7.3.1.6.1 | <i>Preparació dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa</i> | 235 |
| 7.3.1.6.2 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 235 |
| 7.3.1.6.3 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona que incorporen mediadors i diaforasa</i> | 238 |
| 7.3.1.6.4 | <i>Avaluació de la resposta a NADH</i> | 238 |
| 7.3.1.6.5 | <i>Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig</i> | 240 |
| 7.3.2 | BIOSENSORS BASATS EN L'ENZIM HRP COM A CATALITZADOR DE LA REDUCCIÓ DE PERÒXID D'HIDROGEN MEDIATITZADA | 241 |
| 7.3.2.1 | Estudi d'elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP | 241 |
| 7.3.2.1.1 | <i>Preparació dels elèctrodes recoberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen HRP</i> | 241 |
| 7.3.2.1.2 | <i>Avaluació de la resposta a peròxid d'hidrogen</i> | 241 |
| 7.4 | CONCLUSIONS | 243 |
| 7.5 | BIBLIOGRAFIA | 245 |

| |
|--|
| PART IIA. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN ENZIMS DESHIDROGENASES |
|--|

| | | |
|----------|--|-----|
| 8 | DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA | |
| 8.1 | INTRODUCCIÓ | 249 |
| 8.2 | EXPERIMENTAL | 250 |
| 8.2.1 | APARELLS I REACTIUS | 250 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 8.2.1.1 | Aparells | 250 |
| 8.2.1.2 | Reactius | 251 |
| 8.2.2 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA MODIFICATS AMB GELS DE SÍLICE QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT</i> | 251 |
| 8.2.2.1 | Preparació d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB | 252 |
| 8.2.2.1.1 | <i>Avaluació de la resposta d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB</i> | 252 |
| 8.2.2.2 | Preparació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 253 |
| 8.2.2.3 | Avaluació i optimització de la resposta a lactat | 254 |
| 8.2.2.3.1 | <i>Optimització de la composició del gel de sílice</i> | 254 |
| 8.2.2.3.2 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 255 |
| 8.2.2.3.3 | <i>Addició d'agents estabilitzants</i> | 255 |
| 8.2.2.3.4 | <i>Optimització de la temperatura d'anàlisi</i> | 255 |
| 8.2.2.3.5 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 255 |
| 8.2.2.3.6 | <i>Increment de la superfície sensora</i> | 256 |
| 8.2.2.3.7 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa</i> | 256 |
| 8.2.2.3.8 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 256 |
| 8.2.3 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT</i> | 256 |
| 8.2.3.1 | Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 256 |
| 8.2.3.2 | Estudi comparatiu de la resposta a lactat segons l'isozim emprat: M ₄ o H ₄ | 257 |
| 8.2.3.3 | Avaluació i optimització de la resposta a lactat | 257 |
| 8.2.3.3.1 | <i>Optimització del temps d'inversió de fases</i> | 257 |
| 8.2.3.3.2 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 258 |
| 8.2.3.3.3 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 258 |
| 8.2.3.3.4 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa</i> | 258 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 8.2.3.3.5 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 258 |
| 8.2.3.4 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 259 |
| 8.2.3.4.1 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims lactat deshidrogenasa i diaforasa</i> | 260 |
| 8.2.3.5 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 260 |
| 8.2.3.6 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 260 |
| 8.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 261 |
| 8.3.1 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA MODIFICATS AMB GELS DE SÍLICE QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT</i> | 261 |
| 8.3.1.1 | Preparació i avaluació de la resposta d'elèctrodes de configuració plana que incorporen MB | 262 |
| 8.3.1.2 | Preparació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 264 |
| 8.3.1.2.1 | <i>Optimització de la composició del gel de sílice</i> | 265 |
| 8.3.1.2.2 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 266 |
| 8.3.1.2.3 | <i>Addició d'agents estabilitzants</i> | 266 |
| 8.3.1.2.4 | <i>Optimització de la temperatura d'anàlisi</i> | 267 |
| 8.3.1.2.5 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 268 |
| 8.3.1.2.6 | <i>Increment de la superfície sensora</i> | 268 |
| 8.3.1.2.7 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes de configuració plana modificats amb gels de sílice que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa</i> | 269 |
| 8.3.1.2.8 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 271 |
| 8.3.2 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT</i> | 273 |
| 8.3.2.1 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 273 |
| 8.3.2.2 | Estudi comparatiu de la resposta a lactat segons l'isozim emprat: M ₄ o H ₄ | 274 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 8.3.2.2.1 | <i>Optimització del temps d'inversió de fases</i> | 275 |
| 8.3.2.2.2 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 276 |
| 8.3.2.2.3 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 276 |
| 8.3.2.2.4 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa</i> | 277 |
| 8.3.2.2.5 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 280 |
| 8.3.2.3 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 282 |
| 8.3.2.3.1 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims lactat deshidrogenasa i diaforasa</i> | 283 |
| 8.3.2.4 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 285 |
| 8.3.2.5 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa | 286 |
| 8.4 | CONCLUSIONS | 287 |
| 8.5 | BIBLIOGRAFIA | 290 |
| 9 | DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA | |
| 9.1 | INTRODUCCIÓ | 293 |
| 9.2 | EXPERIMENTAL | 296 |
| 9.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 296 |
| 9.2.1.1 | Aparells | 296 |
| 9.2.1.2 | Reactius | 297 |
| 9.2.2 | <i>DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES BIOSENSORS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA EN SOLUCIÓ PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 297 |
| 9.2.2.1 | Optimització de la relació entre les concentracions de substrat i de cofactor | 298 |
| 9.2.2.2 | Optimització de la quantitat d'enzim | 298 |
| 9.2.2.3 | Incorporació de mediadors electropolimeritzats sobre la superfície del transductor | 298 |
| 9.2.3 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOCAMPÒSITS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 299 |
| 9.2.3.1 | Preparació dels biocompòsits amb glutamat deshidrogenasa | 299 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 9.2.3.2 | Avaluació de la resposta a ió amoni | 299 |
| 9.2.3.3 | Incorporació de mediadors en membranes basades en compòsits de polisulfona | 300 |
| 9.2.4 | <i>DESENVOLUPAMENT DE COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT EN PRESENCIA DE GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IÓ AMONI</i> | 300 |
| 9.2.4.1 | Electropolimerització del mediador en presència de glutamat deshidrogenasa | 300 |
| 9.2.5 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IÓ AMONI</i> | 301 |
| 9.2.5.1 | Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa | 301 |
| 9.2.5.2 | Avaluació i optimització de la resposta a ió amoni | 302 |
| 9.2.5.2.1 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 302 |
| 9.2.5.2.2 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 302 |
| 9.2.5.2.3 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 302 |
| 9.2.5.3 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 303 |
| 9.2.5.3.1 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i diaforasa</i> | 303 |
| 9.2.5.4 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 304 |
| 9.2.5.5 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa | 304 |
| 9.2.6 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA PER A LA DETERMINACIÓ D'UREA</i> | 305 |
| 9.2.6.1 | Preparació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa | 305 |
| 9.2.6.2 | Avaluació i optimització de la resposta a urea | 305 |
| 9.2.6.2.1 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 305 |
| 9.2.6.2.2 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 305 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 9.2.6.2.3 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 306 |
| 9.2.6.3 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 306 |
| 9.2.6.3.1 | <i>Recobriments protector dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa, ureasa i diaforasa</i> | 306 |
| 9.2.6.4 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 306 |
| 9.2.6.5 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa | 307 |
| 9.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 307 |
| 9.3.1 | <i>DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES BIOSENSORS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA EN SOLUCIÓ PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 307 |
| 9.3.1.1 | Optimització de la relació entre les concentracions de substrat i de cofactor | 309 |
| 9.3.1.2 | Optimització de la quantitat d'enzim | 310 |
| 9.3.1.3 | Incorporació de mediadors electropolimeritzats sobre la superfície del transductor | 311 |
| 9.3.2 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOCAMPÒSITS AMB GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 314 |
| 9.3.2.1 | Preparació dels biocompòsits amb glutamat deshidrogenasa | 314 |
| 9.3.2.2 | Avaluació de la resposta a ió amoni | 314 |
| 9.3.2.3 | Incorporació de mediadors en membranes basades en compòsits de polisulfona | 315 |
| 9.3.3 | <i>DESENVOLUPAMENT DE COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT EN PRESENCIA DE GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 317 |
| 9.3.3.1 | Electropolimerització del mediador en presència de glutamat deshidrogenasa | 318 |
| 9.3.4 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA PER A LA DETERMINACIÓ D'IO AMONI</i> | 321 |
| 9.3.4.1 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa | 321 |
| 9.3.4.1.1 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 323 |
| 9.3.4.1.2 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 323 |
| 9.3.4.1.3 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 324 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 9.3.4.2 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 327 |
| 9.3.4.2.1 | <i>Recobriments protectors dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i diaforasa</i> | 328 |
| 9.3.4.3 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 329 |
| 9.3.4.4 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa | 330 |
| 9.3.5 | <i>DESENVOLUPAMENT D'ELÈCTRODES MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MEDIADORS QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA PER A LA DETERMINACIÓ D'UREA</i> | 332 |
| 9.3.5.1 | Preparació i validació d'elèctrodes de configuració convencional modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa | 332 |
| 9.3.5.1.1 | <i>Optimització de la quantitat d'enzim</i> | 333 |
| 9.3.5.1.2 | <i>Optimització de la solució amortidora emprada</i> | 334 |
| 9.3.5.1.3 | <i>Estudi de les característiques analítiques</i> | 335 |
| 9.3.5.2 | Incorporació de l'enzim diaforasa com a biocatalitzador | 336 |
| 9.3.5.2.1 | <i>Recobriments protectors dels elèctrodes modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb mediadors que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa, ureasa i diaforasa</i> | 336 |
| 9.3.5.3 | Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig | 337 |
| 9.3.5.4 | Preparació i avaluació d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa | 338 |
| 9.4 | CONCLUSIONS | 340 |
| 9.5 | BIBLIOGRAFIA | 345 |

**PART IIB. DESENVOLUPAMENT I OPTIMITZACIÓ DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS
BASATS EN ENZIMS OXIDASES**

| | | |
|-----------|--|-----|
| 10 | DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS BASATS EN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA | |
| 10.1 | INTRODUCCIÓ | 349 |
| 10.2 | EXPERIMENTAL | 351 |
| 10.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 351 |
| 10.2.1.1 | Aparells | 351 |
| 10.2.1.2 | Reactius | 352 |
| 10.2.2 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN BIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE GLUCOSA BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA</i> | 352 |
| 10.2.2.1 | Preparació dels elèctrodes coberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen GOD | 352 |
| 10.2.2.2 | Estudi de la resposta amperomètrica a glucosa | 353 |
| 10.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 354 |
| 10.3.1 | <i>DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN BIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE GLUCOSA BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUCOSA OXIDASA</i> | 354 |
| 10.3.1.1 | Preparació i avaluació dels elèctrodes coberts amb membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb metalls que incorporen GOD | 354 |
| 10.3.1.2 | Estudi de la resposta amperomètrica a glucosa | 355 |
| 10.4 | CONCLUSIONS | 358 |
| 10.5 | BIBLIOGRAFIA | 360 |

PART III. IMPLEMENTACIÓ DELS SENSORS DESENVOLUPATS EN SISTEMES DE FLUX

| | | |
|-----------|--|-----|
| 11 | IMPLEMENTACIÓ A UN SISTEMA DE FLUX DE QUIMIOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH | |
| 11.1 | INTRODUCCIÓ | 365 |
| 11.2 | EXPERIMENTAL | 366 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 11.2.1 | APARELLS I REACTIUS | 366 |
| 11.2.1.1 | Aparells | 366 |
| 11.2.1.2 | Reactius | 367 |
| 11.2.2 | DISSENY I AVALUACIÓ DE TRANSDUCTORS DE CONFIGURACIÓ PLANA COM A ELÈCTRODES DE TREBALL D'UN SISTEMA DE FLUX AMB DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DE NADH | 367 |
| 11.2.2.1 | Construcció de transductors de platí i de grafit de configuració plana | 367 |
| 11.2.2.2 | Caracterització electroquímica | 369 |
| 11.2.2.3 | Avaluació de la resposta a NADH en un sistema de flux | 369 |
| 11.2.3 | AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT A LA SUPERFÍCIE SENSORA | 370 |
| 11.2.3.1 | Electropolimerització del mediador sobre la superfície d'un transductor de configuració plana | 370 |
| 11.2.3.2 | Caracterització electroquímica | 371 |
| 11.2.3.3 | Estudi de la resposta a NADH | 371 |
| 11.2.3.4 | Estudi de la dinàmica de resposta | 371 |
| 11.2.3.5 | Estudi de l'eficiència dels mediadors electropolimeritzats | 372 |
| 11.2.4 | AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH PREPARAT AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MEDIADORS | 372 |
| 11.2.4.1 | Preparació dels elèctrodes de configuració plana amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb mediadors | 372 |
| 11.2.4.2 | Caracterització electroquímica | 373 |
| 11.2.4.3 | Estudi de la resposta a NADH | 373 |
| 11.2.4.4 | Estudi de la dinàmica de resposta | 373 |
| 11.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 374 |
| 11.3.1 | DISSENY I AVALUACIÓ DE TRANSDUCTORS DE CONFIGURACIÓ PLANA COM A ELÈCTRODES DE TREBALL D'UN SISTEMA DE FLUX AMB DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DE NADH | 374 |
| 11.3.1.1 | Construcció de transductors de platí i de grafit de configuració plana | 374 |
| 11.3.1.2 | Caracterització electroquímica | 374 |
| 11.3.1.3 | Avaluació de la resposta a NADH en un sistema de flux | 375 |
| 11.3.2 | AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH | |

| | | |
|-----------|---|-----|
| | <i>AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT A LA SUPERFÍCIE SENSORA</i> | 378 |
| 11.3.2.1 | Caracterització electroquímica | 378 |
| 11.3.2.2 | Estudi de la resposta a NADH | 379 |
| 11.3.2.3 | Estudi de la dinàmica de resposta | 384 |
| 11.3.2.4 | Estudi de l'eficiència dels mediadors electropolimeritzats | 386 |
| 11.3.3 | <i>AVALUACIÓ EN UN SISTEMA DE FLUX D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH PREPARAT AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MEDIADORS</i> | 387 |
| 11.3.3.1 | Caracterització electroquímica | 387 |
| 11.3.3.2 | Estudi de la resposta a NADH | 388 |
| 11.3.3.3 | Estudi de la dinàmica de resposta | 395 |
| 11.4 | CONCLUSIONS | 397 |
| 11.5 | BIBLIOGRAFIA | 400 |
| 12 | IMPLEMENTACIÓ A UN SISTEMA DE FLUX DE BIOSENSORS AMPEROMÈTRICS PER A LA DETERMINACIÓ DE LACTAT, AMONI I UREA | |
| 12.1 | INTRODUCCIÓ | 401 |
| 12.2 | EXPERIMENTAL | 402 |
| 12.2.1 | <i>APARELLS I REACTIUS</i> | 402 |
| 12.2.1.1 | Aparells | 402 |
| 12.2.1.2 | Reactius | 403 |
| 12.2.2 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A LACTAT, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA</i> | 403 |
| 12.2.2.1 | Preparació i avaluació de la resposta a lactat d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux | 403 |
| 12.2.3 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A IÓ AMONI, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA</i> | 404 |
| 12.2.3.1 | Preparació i avaluació de la resposta a ió amoni d'elèctrodes de configuració plana modificats | |

| | | |
|----------|---|-----|
| | amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux | 404 |
| 12.2.4 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A UREA, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA</i> | 405 |
| 12.2.4.1 | Preparació i avaluació de la resposta a urea d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa, implementats a un sistema de flux | 405 |
| 12.3 | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 406 |
| 12.3.1 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A LACTAT, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM LACTAT DESHIDROGENASA</i> | 406 |
| 12.3.1.1 | Avaluació de la resposta a lactat d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim lactat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux | 406 |
| 12.3.2 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A IÓ AMONI, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN L'ENZIM GLUTAMAT DESHIDROGENASA</i> | 409 |
| 12.3.2.1 | Avaluació de la resposta a ió amoni d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen l'enzim glutamat deshidrogenasa, implementats a un sistema de flux | 409 |
| 12.3.3 | <i>DESENVOLUPAMENT DE BIOSENSORS PER A UREA, IMPLEMENTATS A UN SISTEMA DE FLUX, PREPARATS AMB ELÈCTRODES DE CONFIGURACIÓ PLANA, MODIFICATS AMB MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA AMB MB QUE INCORPOREN ELS ENZIMS GLUTAMAT DESHIDROGENASA I UREASA</i> | 412 |
| 12.3.3.1 | Avaluació de la resposta a urea d'elèctrodes de configuració plana modificats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona amb MB que incorporen els enzims glutamat deshidrogenasa i ureasa, implementats a un sistema de flux | 412 |
| 12.4 | CONCLUSIONS | 415 |
| 12.5 | BIBLIOGRAFIA | 416 |

CONCLUSIONS GENERALS

| | |
|----------------------|-----|
| CONCLUSIONS GENERALS | 417 |
|----------------------|-----|

ANNEXOS

| | |
|---------|-----|
| ANNEX A | 419 |
| ANNEX B | 421 |

ABREVIATURES

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| § | apartat |
| AC | acetat de cel·lulosa |
| APTMS | 3-aminopropiltrimetoxisilà |
| CMC | carboximetil cel·lulosa |
| DCPIP | diclorofenolindofenol |
| D_r | coeficient de difusió aparent |
| 3,4-DHB | 3,4-dihidroxibenzaldehid |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| Dp | enzim diaforasa |
| E | potencial electroquímic |
| E_{an} | potencial anòdic |
| E_{ap} | potencial de treball |
| E_{cat} | potencial catòdic |
| EDS | espectrometria d'energia dispersiva |
| F | constant de Faraday |
| FIA | <i>Flow Injection Analysis</i> |
| GIDH | enzim glutamat deshidrogenasa |
| GOD | enzim glucosa oxidasa |
| HEC | hidroxietil cel·lulosa |
| HRP | enzim peroxidasa de rave picant |
| i | intensitat amperomètrica |
| i_d | corrent de difusió |

| | |
|--------------------------|--|
| K_M | constant de Michaelis-Menten |
| K_M^{ap} | constant de Michaelis-Menten aparent |
| LDH | enzim lactat deshidrogenasa |
| LOx | enzim lactat oxidasa |
| M | mediador d'oxidació-reducció |
| MB | <i>Meldola Blue</i> |
| n | número d'electrons |
| NAD ⁺ /NADH | nicotin adenin dinucleòtid (espècies oxidada i reduïda, respectivament) |
| NADP ⁺ /NADPH | nicotin adenin dinucleòtid fosfat (espècies oxidada i reduïda, respectivament) |
| o-PDA | o-fenilendiamina |
| p-BQ | p-benzoquinona |
| PEG | polietilenglicol |
| Ps | polisulfona |
| PVA-SbQ | acetat de polivinil amb residus stiril piridini |
| PVC | clorur de polivinil |
| PVOH | polivinil alcohol |
| PVP | polivinil pirrolidona |
| RSD | desviació estàndard relativa |
| S_p | àrea superficial específica |
| TCNQ | tetracianoquinodimetà |
| TEOS | tetraetoxisilà |
| TG-DTA | anàlisi tèrmica diferencial |
| TTF | tetratiafulvalè |
| v | velocitat d'escombrat |
| V_p | volum específic de porus |

1 INTRODUCCIÓ

Des dels inicis de la humanitat, el desig d'extreure informació de tot el que ens envolta, ha estat un dels motius principals que ha dut a l'evolució de les societats. La informació adquirida ha permès, al llarg de la història, crear coneixements que han estat el fonament del desenvolupament de la capacitat per prendre decisions.

Dins del context d'aquesta cerca per reduir la incertesa amb l'adquisició d'informació, la química s'ha dirigit al coneixement de sistemes materials, mitjançant una seqüència d'etapes que es coneix com a *procés analític* (vegeu Figura 1.1(A)).

1.1 SENSORS

A finals del segle XIX apareix per primera vegada el concepte del que actualment coneixem amb el nom de *sensor*. Però no és fins a la segona meitat del segle XX, amb l'aparició del primer elèctrode per mesurar la pressió d'oxigen en sang¹, quan es consolida el desenvolupament del camp dels sensors, com a resultat de l'intent d'integració i, com a conseqüència, de simplificació del procés analític global.² Un sensor es pot definir com a un dispositiu analític que permet fer mesures de paràmetres físics, químics o biològics, amb la finalitat d'aportar informació.

Els sensors es caracteritzen per ser:

- ✓ *simples*, fet que permet que siguin emprats per personal no especialitzat,
- ✓ *portàtils*, la qual cosa implica que han de ser robustos i de dimensions reduïdes,
- ✓ capaços de generar informació fiable en temps real, de manera que fan possible l'obtenció d'informació en continu, essent sovint fàcilment implementables en sistemes de flux.

Els *sensors químics* integren el procés analític en dues etapes. Com es pot veure a la Figura 1.1 (B), la primera etapa correspon a la *codificació* de la quantitat d'analit present a la mostra en un *senyal primari* (de tipus òptic, màssic, tèrmic, magnètic, manomètric o elèctric), originat per la *interacció selectiva* d'un component de reconeixement molecular amb l'analit. Mentre que a la segona etapa té lloc la *decodificació* del senyal, mitjançant un procés de *transducció* basat en l'acció del *transductor*, adreçada a transformar el senyal primari en un *senyal secundari*, normalment de tipus elèctric, que conté la informació analítica.

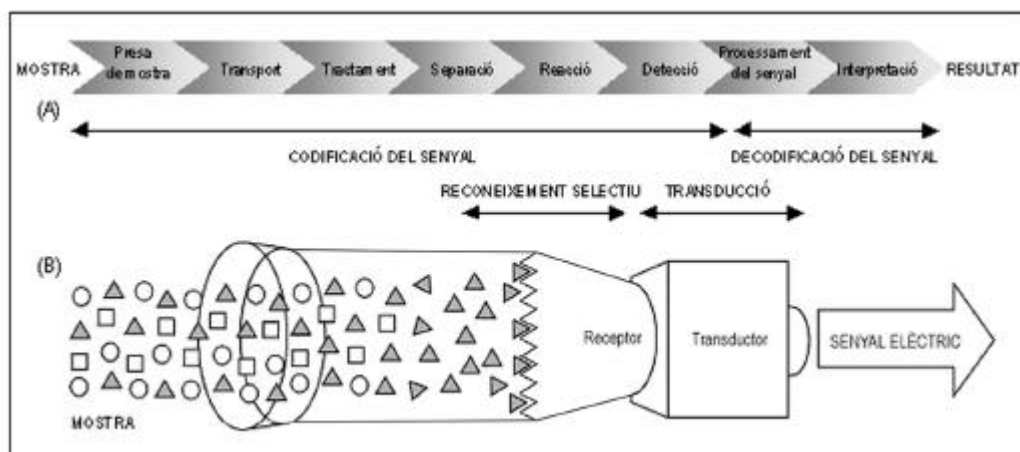


Figura 1.1: (A) Seqüència d'etapes del procés analític tradicional. (B) Integració del procés analític en dues etapes que constitueixen el principi bàsic de funcionament d'un sensor. Una primera etapa de reconeixement selectiu, en què l'analit present a la mostra interacciona específicament amb el receptor per donar un senyal primari. I una segona etapa de transducció del senyal primari en un senyal de tipus elèctric que serà amplificat i processat a fi de poder interpretar els resultats obtinguts.

1.1.1 TRANSDUCCIÓ

La paraula transducció prové del mot llatí *transducere*, que es pot traduir per l'expressió *fer passar a través*. Aquesta definició es correspon amb la funció analítica del procés de transducció, que implica el pas de l'energia obtinguda en l'etapa de reconeixement cap a un senyal físic útil per extreure informació analítica de la mostra.³ Aquest senyal físic acostuma a ésser de tipus elèctric, a fi de facilitar l'obtenció, el tractament i l'avaluació de la informació analítica d'interès.

Una de les possibles classificacions dels sensors químics, fonamentada en els diferents mecanismes de transducció, inclou *dispositius electroquímics, òptics, màssics, termomètrics, magnètics, manomètrics* o *elèctrics* entre d'altres.

Sensors òptics

Mesuren canvis de propietats òptiques com a resultat de la interacció selectiva de l'analit amb la part receptora del sensor. Si l'analit és òpticament actiu, es duu a terme el mesurament directe de propietats òptiques com l'absorbància, la fluorescència, la luminiscència, la reflectància, l'índex de refracció o la dispersió de la llum. Però si l'analit no és òpticament actiu, s'ha de fer la mesura de forma indirecta a través d'un agent marcador que modifiqui les seves propietats òptiques com a resultat de la interacció de l'analit amb el receptor.

La propietat òptica mesurada en ambdós casos pot ser qualsevol propietat en què es fonamenten els mètodes òptics tradicionals i l'elecció d'una en concret dependrà de les característiques de l'analit, de la sensibilitat desitjada i de l'aplicació final del sensor.

L'avenç tecnològic en el camp de les comunicacions ha conduït, darrerament, a una ràpida expansió d'aquests dispositius, especialment d'aquells que utilitzen la fibra òptica com a suport físic, atesa la seva robustesa i alhora flexibilitat. Aquests sensors òptics s'anomenen *òptodes*.

Sensors màssics

Es basen en la mesura del canvi de la freqüència d'oscil·lació de les ones acústiques generades quan s'aplica un camp elèctric oscil·lant sobre un cristall anisotròpic (piezoelèctric).

L'ús de cristalls piezoelèctrics com a sensors sensibles a la massa es basa en els canvis de la freqüència d'oscil·lació que s'originen al modificar la seva massa, degut a adsorcions, deposicions o al propi procés de reconeixement i posterior interacció de l'analit per part de l'element receptor que es troba immobilitzat al cristall.

Quan es mesura la disminució de la freqüència de ressonància de les ones de volum generades per un oscil·lador, es parla de *dispositius d'ones acústiques de volum (BAW)*. Mentre que quan es mesura el canvi de la velocitat de propagació de l'ona acústica sobre una superfície sensible als canvis de massa es fa referència a *dispositius d'ones superficials (SAW)*.⁴

Sensors tèrmics

Permeten detectar la presència de determinades espècies químiques o mesurar la seva concentració mitjançant canvis de temperatura provocats per les pròpies espècies que, o bé alteren la conductivitat tèrmica del medi, o bé poden donar lloc a reaccions endotèrmiques o exotèrmiques, amb la consegüent absorció o despreniment de calor que aquestes comporten. En ambdós casos es modifica la temperatura superficial del sensor.

Entre els diferents tipus de dispositius termomètrics cal esmentar els que permeten fer mesures en sistemes adiabàtics, on es troben inclosos els *termistors*, que detecten petites variacions de temperatura.

Sensors magnètics

Es basen en la mesura dels canvis que es produeixen en les propietats paramagnètiques de les espècies implicades en la reacció d'interacció selectiva de l'analit amb la part receptora del sensor.⁵

Sensors manomètrics

Es fonamenten en el seguiment de reaccions que impliquen la presència d'un gas dissolt, mitjançant els canvis de la concentració d'aquest gas, que es poden mesurar a una cavitat tancada com a variacions de la pressió parcial d'aquest gas.⁶ El gas que permet fer el seguiment es troba repartit entre la fase

líquida i la gasosa, però és en aquesta darrera fase on té lloc la detecció. Per tant, puix que la fase gasosa correspon a un medi molt més simple, s'evita haver d'aplicar etapes de pre-tractament per a eliminar espècies que podrien interferir a la mesura, de manera que les interferències químiques no suposen cap inconvenient per a l'ús d'aquest tipus de sensors.

Sensors elèctrics

Aquest tipus de dispositius basen el seu sistema de mesura en els canvis de les propietats elèctriques que s'obtenen com a resultat de la interacció selectiva de l'analit amb la superfície sensora, sense que intervinguin processos electroquímics.

Sensors electroquímics

Aprofiten els fenòmens bàsics de transferència de càrrega i d'electrons per extreure informació analítica útil de la interacció electroquímica entre l'analit i l'elèctrode.⁷

Són els més habituals, atesa la simplicitat amb què es pot relacionar el senyal mesurat (comunament intensitat o potencial) i la quantitat d'analit present a la mostra.

Es poden classificar, en funció de la tècnica electroquímica en què es fonamenten, en *dispositius potenciomètrics* i *amperomètrics*.

1.1.1.1 Dispositius potenciomètrics

El funcionament d'aquests dispositius es fonamenta en el principi bàsic de la potencimetria, segons el qual es genera una diferència de potencial entre les parets de la doble capa formada com a resultat de la interacció entre l'elèctrode i la solució. L'increment de la densitat de càrrega sobre la superfície de l'elèctrode esdevé el resultat de la redistribució de càrrega que s'origina quan es posen en contacte dues fases.

Una forma de fer selectiva la resposta d'aquests sensors consisteix en utilitzar una membrana selectiva a un determinat ió, de manera que la doble capa només es generi en presència d'una espècie química concreta. Això és el que s'anomena un *elèctrode selectiu d'ions (ESI)*.

Elèctrodes selectius d'ions

Els elèctrodes selectius d'ions requereixen l'ús d'una membrana selectiva a un determinat ió, que ha d'estar en contacte per ambdós costats amb solucions de diferent activitat de l'esmentat ió, a fi de generar una diferència de potencial entre les dues cares de la membrana (potencial de membrana). Aquest potencial de membrana (E_m) s'expressa com la diferència entre el potencial (E_1) generat entre la membrana i la mostra (s_1) i el potencial (E_2) generat entre la membrana i una solució interna (s_2). Atès que aquest potencial segueix la *lleï de Nernst* es pot expressar com:

$$E_m = E_1 - E_2 = \left(E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{i(s_1)}}{a_{im}} \right) - \left(E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{i(s_2)}}{a_{im}} \right) = \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{i(s_1)}}{a_{i(s_2)}} \quad (1.1)$$

on E^0 és una constant que depèn de les característiques físiques de la membrana, R la constant dels gasos, T la temperatura, n la càrrega de l'ió, F la constant de Faraday i $a_{i(s_1)}$, $a_{i(s_2)}$ i a_m les activitats de l'ió, al qual és selectiva la membrana, a la mostra, a la solució interna i a l'interior de la membrana, respectivament.

Ara bé, per poder mesurar aquest potencial de membrana només ha de variar el potencial generat entre la membrana i la mostra i això s'aconsegueix fixant la a_i de la solució interna, ja que d'aquesta manera el potencial de la interfase solució interna-membrana es manté constant i, per tant, serveix com a referència. Aleshores el potencial mesurat pel potenciòmetre correspon a:

$$\Delta E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln a_{i(s_1)} \quad (1.2)$$

on ΔE correspon a la diferència de potencial de la membrana i $E^{0'}$ és un terme que conté tots els potencials constants del sistema potenciomètric.

Normalment però, no interessa treballar amb activitats. Per això sovint s'utilitza un medi amb força iònica elevada a fi de mantenir constant el coeficient d'activitat, la qual cosa permet obtenir el potencial com a funció directa de la concentració de l'ió, en el cas que no hi hagi espècies interferents:

$$\Delta E = E^{0''} + \frac{RT}{nF} \ln C_{i(s_1)} \quad (1.3)$$

on $E^{0''}$ inclou el terme constant corresponent al coeficient d'activitat, a més de $E^{0'}$.

L'*equació de Nikolsky*, corresponent a una modificació de la teoria fins ara referida, inclou un terme addicional on es considera l'efecte de les possibles interferències: ⁸

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_n K_{i,jn}^{pot} a_{jn}^{\frac{z_i}{z_j}} \right) \quad (1.4)$$

on i és l'ió d'interès i $j_{1..n}$ representen els ions interferents. El terme K^{pot} és la constant de selectivitat potenciomètrica, que dona idea del pes amb què participen els ions interferents a la resposta potenciomètrica final, la qual també es veu afectada per la càrrega (z) dels ions presents a la mostra.

En els darrers anys, s'ha fet un pas endavant en relació a la configuració clàssica dels elèctrodes selectius a ions que, com ja s'ha explicat prèviament, incorpora solucions internes que actuen com a referència. Aquest avenç s'ha dut a terme mitjançant l'aparició d'elèctrodes basats en el què es coneix

com a *all-solid-state*, és a dir, configuracions en què l'elèctrode de referència interna manté contacte directe (contacte sòlid) amb la superfície de la membrana.⁹

1.1.1.2 Dispositius amperomètrics

El fonament d'aquests dispositius recau en la base de l'amperometria, que consisteix en la mesura de la intensitat de corrent que circula per una cel·la electroquímica que conté espècies electroactives. La generació d'aquest corrent prové de l'aplicació d'un potencial extern capaç de provocar la transferència electrònica entre l'elèctrode de treball i una espècie en dissolució, a fi que aquesta pugui ésser oxidada o reduïda.

Amb la finalitat d'aplicar el potencial adequat, la cel·la consta de 3 elèctrodes: un *elèctrode indicador o de treball*, sobre la superfície del qual té lloc la reacció electroquímica, un *elèctrode auxiliar*, que serveix de contraelèctrode per tancar el circuit, i un *elèctrode de referència*, que assegura que el potencial aplicat és el que es vol imposar a fi que la reacció electroquímica tingui lloc.

El potencial a imposar ha de comptar amb la caiguda de potencial (iR) que s'origina quan hi ha pas de corrent a través de la cel·la:

$$E_{ap} = E_{cat} - E_{an} - iR \quad (1.5)$$

on E_{ap} , E_{cat} i E_{an} corresponen al potencial a aplicar i als potencials catòdic i anòdic, respectivament.

La intensitat de corrent és una mesura directa de la velocitat de la reacció electroquímica i, per tant, segons les *lleis de Faraday*, és alhora funció de la concentració de l'espècie electroactiva oxidada o reduïda sobre l'elèctrode de treball. Ara bé, aquesta velocitat de reacció depèn de la velocitat de transferència de càrrega i de la velocitat de transport de matèria, que sinó són les adequades, provoquen un pas de corrent inferior a l'esperat i aleshores es parla de polarització de l'elèctrode.

En un primer cas es pot parlar de *polarització cinètica* de l'elèctrode quan la velocitat de transferència de càrrega entre l'elèctrode i l'espècie en solució és lenta. En aquest cas, és necessari un aportament de potencial addicional perquè la reacció pugui transcórrer. Aquesta velocitat depèn de les característiques de l'elèctrode i de l'estat físic de l'analit (quan intervé un gas a la reacció electroquímica, la velocitat de transferència de càrrega és molt més petita).

Li resta parlar d'un segon cas, la *polarització per concentració*, relacionada amb la velocitat de transport de matèria al si de la solució, que esdevé el punt més important per a les mesures d'interès analític. Aquest fenomen té lloc quan la intensitat de corrent és inferior a l'esperada per a un determinat potencial de treball, degut a que el transport d'espècie electroactiva cap a la superfície de l'elèctrode és massa lent, de manera que actua com a limitant de la reacció, atès que provoca una manca de reactiu sobre la superfície de l'elèctrode. La velocitat de transport en aquestes condicions és funció de la concentració d'espècie electroactiva en el si de la solució, de manera que si s'aconsegueix controlar la

resta de factors que poden influir en el transport, es podrà extreure informació analítica. Per això convé assegurar un transport continu i controlat de l'analit cap a la superfície de l'elèctrode. Per aconseguir-ho, es facilita la *convecció*, amb l'aplicació d'una agitació constant, i es minimitza la *migració*, amb la incorporació al medi d'un electròlit inert concentrat que asseguri una força iònica elevada.

En aquestes condicions, la solució està sotmesa a un règim turbulent, però a una distància de l'elèctrode d'unes quantes micres, s'estableix un flux laminar que dona lloc a l'anomenada *capa de difusió de Nernst*, on l'únic fenomen responsable del transport de matèria és la *difusió*. En aquesta capa la velocitat de transport de matèria segueix la *1a llei de Fick*, és a dir, la intensitat de corrent esdevé funció de la concentració d'analit a la solució.

L'expressió general per a la intensitat de corrent que inclou tots els paràmetres que incideixen en el seu valor és la següent:¹⁰

$$i = \frac{nFADC_a}{\delta} \quad (1.6)$$

on n és el nombre d'electrons que es transfereixen a la reacció electroquímica, F és la constant de Faraday, A és l'àrea de l'elèctrode de treball, D és el coeficient de difusió, C_a és la concentració de l'espècie electroactiva i δ és el gruix de la capa de difusió.

Ara bé, si s'aconsegueix mantenir constant la capa de difusió, l'equació es simplifica per donar:

$$i = KC_a \quad (1.7.)$$

Aquesta equació palesa la relació directa entre la propietat química (concentració) que es vol conèixer i la magnitud física (intensitat de corrent) mesurada.

No obstant això, el principal problema d'aquests dispositius és que la seva selectivitat es veu limitada pel potencial aplicat ja que, a part de l'espècie d'interès, també es podran oxidar o reduir totes aquelles espècies que tinguin un potencial d'oxidació o de reducció inferior a l'aplicat. És per això que es considera un punt clau en el desenvolupament dels sensors químics la possibilitat de *modificar-los químicament o biològicament* a fi de reduir el potencial de treball, fet que disminueix el número d'interferències i millora les seves característiques de selectivitat i, en alguns casos, de sensibilitat.

Caracterització dels transductors amperomètrics

Com ja s'ha comentat prèviament, sovint es requereix l'aplicació d'un sobrepotencial a fi que la reacció electroquímica es produeixi. Atès que aquest valor de potencial depèn del tipus i característiques de l'elèctrode i de l'analit, és necessari fer una determinació experimental, en les condicions en què es durà a terme l'anàlisi, a fi de determinar-lo.

És en aquest context on apareix la *voltamperometria cíclica* com a una tècnica útil per caracteritzar el comportament electroquímic, en un ampli interval de potencial, d'un transductor i de les espècies

electroactives presents a una determinada mostra. Per tant, la voltamperometria cíclica és una tècnica habitual per fer un estudi electroanalític previ.

Aquesta tècnica consisteix en mesurar la intensitat de corrent que s'obté de la variació lineal del potencial aplicat en funció del temps, és a dir, quan es realitza un escombrat des d'un potencial inicial a un potencial determinat i s'inverteix després el sentit de l'escombrat, per tornar de nou al potencial de partida (vegeu Figura 1.2).

El que s'obté com a resultat és un *voltamperograma* on està representada la intensitat de corrent (i) que circula entre l'electrode de treball i l'auxiliar, en funció del potencial aplicat a cada moment.

A la Figura 1.2. es mostra el voltamperograma característic d'un sistema redox reversible senzill, és a dir, sense cap reacció lateral.

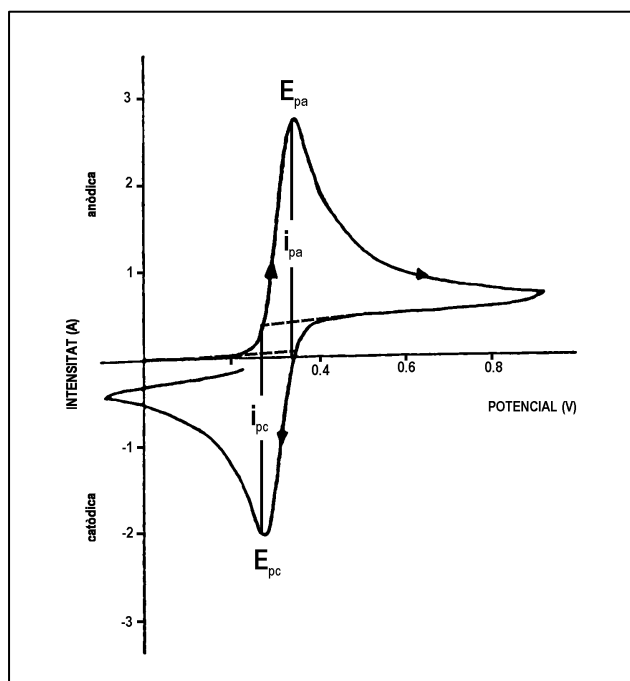


Figura 1.2: Voltamperograma cíclic característic d'un sistema redox reversible.

En anar cap a potencials positius l'electrode es converteix en un oxidant de manera que, si inicialment es té tota l'espècie electroactiva en la seva forma reduïda, s'afavoreix la seva oxidació sobre la superfície de l'electrode, la qual cosa provoca un augment de la intensitat anòdica.

Atès que les mesures es fan en solucions sense agitació, aquesta intensitat deixa d'augmentar un cop s'ha consumit tota l'espècie que es troba en contacte amb l'elèctrode i únicament arriba analític per difusió, de manera que hi ha un decreixement del senyal i s'obté, com a conseqüència, un pic d'intensitat.

Després s'inverteix el sentit de l'escombrat de potencial i, en anar cap a potencials negatius, l'elèctrode esdevé un reductor que provoca la reducció de les espècies oxidades que s'han acumulat durant el procés anterior sobre la seva superfície. Això ocasiona un augment de la intensitat catòdica fins a un valor màxim, que correspon al punt en què ja s'haurà consumit tota l'espècie oxidada present a la superfície de l'elèctrode i, per tant, el senyal comença a decreixer.

Els paràmetres més importants, per a un estudi qualitatiu d'un sistema redox concret, que s'obtenen d'un voltamperograma cíclic són els *potencials* i les *intensitats de corrent* dels pics *anòdic* (E_{pa} i i_{pa}) i *catòdic* (E_{pc} i i_{pc}) respectivament. Amb aquestes dades es pot saber si un sistema redox senzill és reversible, ja que aleshores ha de complir les següents condicions:

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = 0.059/n \quad (1.8)$$

$$i_{pa} / i_{pc} = 1 \quad (1.9)$$

Així, per a un sistema reversible la separació entre pics permet conèixer el número d'electrons transferits, mentre que la relació d'intensitats dels pics aporta informació sobre possibles reaccions acoblades a la reacció redox que s'està avaluant. Per una banda, el fet que un sistema sigui irreversible implica que la velocitat de transferència electrònica entre l'espècie electroactiva i l'elèctrode és lenta i això queda manifest amb l'obtenció d'una separació dels pics anòdic i catòdic més gran de la fixada per l'equació (1.8). Per tant, els voltamperogrames són útils com a una eina que permet avaluar la cinètica de reaccions de transferència electrònica en sistemes heterogenis (elèctrode-solució). D'altra banda, petites reduccions de l'alçada de pic en cicles successius, poden ésser conseqüència de la implicació d'alguna reacció homògena amb la qual s'està consumint espècie electroactiva per donar un producte sense propietats redox. En canvi, l'augment progressiu de l'alçada dels pics en voltamperogrames consecutius, pot ésser el resultat d'adsorcions no desitjades que acumulen l'espècie electroactiva sobre la superfície de l'elèctrode.¹¹ Com a conseqüència de tot això, s'extreu com a conclusió que els voltamperogrames també poden aportar informació sobre reaccions químiques laterals, precedents o posteriors a la transferència electrònica, que impliquen l'aparició o el consum d'espècies electroactives a la solució.

1.1.2 RECONeixEMENT SELECTIU

Fins ara s'ha parlat de l'etapa de transducció en què el transductor rep un tipus d'energia determinada i la transforma en un senyal útil de tipus elèctric. Aquesta energia, que codifica la informació analítica continguda a la mostra, prové d'una etapa prèvia de *reconeixement selectiu*.

Hom ha vist que el transductor en si mateix no ha de presentar selectivitat. Per això esdevé necessari un component receptor previ al transductor que s'encarregarà del reconeixement selectiu de l'analit a fi de transformar la informació química de la mostra que es vol obtenir, en l'energia que arriba al transductor.

Inicialment, el reconeixement selectiu va aprofitar els fonaments de les reaccions emprades a l'anàlisi química clàssica. Però atès que el concepte de sensor va lligat al de simplicitat en el mesurament i, per tant, exclou totes les etapes prèvies de tractament de la mostra dirigides a eliminar interferències, s'observà que les reaccions tradicionalment usades per l'anàlisi química no eren prou selectives i això limità en gran mesura el desenvolupament dels sensors.

Posteriorment però, s'ha avançat molt en el disseny molecular i la síntesi de reactius capaços de formar complexos receptor-analit altament selectius, tant per mecanismes físics (forma, dimensions,...) com químics (energies d'enllaç,...). Quan s'incorpora un receptor d'aquest tipus a la configuració d'un sensor es parla de *quimiosensors*. Així els components receptors d'un quimiosensor es poden incloure en els següents grups:

Ionòfors o portadors mòbils, són molècules orgàniques que s'usen especialment com a receptors de cations, però també d'anions.

Receptors moleculars, són molècules receptores de grans dimensions amb cavitats de geometries determinades, algunes hidròfiles i d'altres lipòfiles segons convingui, a fi de fer més selectiva la interacció amb molècules neutres. En alguns casos, aquests receptors moleculars es sintetitzen químicament mitjançant l'entrecruament d'un polímer en presència de l'analit, que actua com a patró (*template*). A continuació s'elimina l'analit i així s'obtenen *molecularly imprinted polymers* (MIP)¹², dissenyats per a augmentar significativament la selectivitat dels sensors que els incorporin. Sovint, es treballa amb models per ordinador del monòmer escollit, a fi d'originar múltiples dissenys que, més endavant, permetran fer una selecció entre els *molecularly imprinted polymers* que formen la biblioteca virtual generada, segons les necessitats específiques del sensor a desenvolupar.¹³

Malgrat que aquests receptors compleixen amb la selectivitat química requerida pels sensors, cal remarcar el desenvolupament que han tingut els *biosensors* durant les quatre últimes dècades,¹⁴ atès que aquests dispositius incorporen, en la seva configuració, material biològic altament selectiu, com a responsable del reconeixement molecular. Aquest reconeixement molecular és un terme que queda adscrit al de selectivitat química, però més concretament en aquest cas fa referència a interaccions molt específiques que no només impliquen complementaritat estructural, sinó que alhora porten implícita una funció biològica. Així, els biosensors han revolucionat el camp dels sensors amb l'aprofitament del reconeixement molecular de determinats sistemes biològics.

Dins dels components biològics que s'utilitzen com a bioreceptors es troben els ***enzims***, les ***espècies immunològiques***, els ***àcids nucleics*** i els ***receptors químics***.

1.1.2.1 Enzims

Els *enzims* són proteïnes (a excepció d'un petit grup de molècules de RNA catalític) que catalitzen les reaccions químiques dels sistemes biològics. Això vol dir que faciliten la transformació selectiva d'un substrat específic (S) en un producte (P), la qual cosa es veu reflectida en un augment de la velocitat d'aquesta reacció, sense que hi hagi consum d'enzim, atès que aquest es regenera.

La funció catalítica que realitza l'enzim ve determinada per la seva estructura tridimensional, resultat del plegament relativament complex i molt precís de la cadena polipeptídica.

Sovint és a l'interior d'aquesta estructura proteica on es troba el seti actiu de l'enzim, que correspon a un grup format per entre 5 i 10 aminoàcids.¹⁵ Aquests aminoàcids estan ordenats segons una seqüència específica que dicta la conformació tridimensional que ha d'adoptar el seti actiu a fi d'interaccionar selectivament amb el substrat.

La possibilitat d'establir interaccions de diversa naturalesa (iòniques, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals,...) entre l'entorn del seti actiu i el substrat, permet assolir l'estat de transició amb una reducció important del cost energètic, a més de fer més selectiu l'accés del substrat enfront d'altres molècules. És per aquest darrer motiu que hom pot afirmar que un enzim presenta un nivell d'especificitat significativament superior al d'un catalitzador sintètic.

Si bé aquesta és la propietat més important dels enzims que els fa idonis per a la construcció de biosensors altament selectius, un altre paràmetre important en el disseny de biosensors és la sensibilitat, que en el cas dels biosensors enzimàtics ve limitada pel grau d'afinitat de l'enllaç enzim-substrat i per la velocitat de la reacció d'obtenció del producte. Si es considera la possibilitat de fer mesures en continu, degut a que l'enzim no es consumeix, i els alts nivells de selectivitat i sensibilitat implícits a les reaccions enzimàtiques, hom comprèn que el camp de la recerca i el desenvolupament dels biosensors hagi estat estretament relacionat durant anys amb el dels biosensors enzimàtics.

Com a alternativa a la immobilització d'enzims per a la construcció de biosensors, en determinats casos s'han emprat cèl·lules o òrgànuls cel·lulars i, fins i tot, microorganismes sencers o fragments de teixits vegetals o animals. El comportament dels biosensors basats en aquest tipus de material biològic és comparable al mostrat pels biosensors equivalents que incorporen únicament l'enzim d'interès, amb alguns avantatges addicionals. Entre aquests avantatges hom destaca una significativa reducció del cost de construcció, atès que s'eviten els processos de purificació, una major activitat biocatalítica, com a conseqüència de l'elevat contingut enzimàtic en cèl·lules i teixits, juntament amb una millora de l'estabilitat, car en aquests casos els enzims es troben al seu medi natural. A més, en determinats casos es poden guardar en un medi de creixement cel·lular adequat que servirà per regenerar les cèl·lules mortes i, en definitiva, allargarà el temps de vida del biosensor. No obstant això, també presenten alguns inconvenients, com són una selectivitat no tan acurada, i temps de recuperació de l'activitat enzimàtica força lents.

1.1.2.2 Anticossos i antigens

Els *anticossos* o *immunoglobulines* (Ab) són proteïnes especialitzades sintetitzades pels limfòcits B dels organismes vertebrats com a resposta a l'aparició de substàncies estranyes, que reben el nom d'*antigens* (Ag). Aquest procés de producció d'anticossos com a conseqüència de la presència d'antigens en la circulació sanguínia dels animals es coneix com a *resposta immunològica* i es caracteritza per ésser un procés altament selectiu, ja que en molts casos un determinat anticòs és capaç de reconèixer un sol antigen. L'elevada especificitat d'aquesta interacció antigen-anticòs, palesa en constants d'afinitat superiors a les que mostren els enzims vers els seus substrats, ha estat aprofitada amb finalitats analítiques per les *tècniques d'immunoassaig*.

Dins les tècniques d'immunoassaig, els *immunosensors*^{16,17} en són un exemple. Aquests dispositius analítics incorporen un antigen o un anticòs com a base del reconeixement selectiu de l'analit que es troba a la mostra. Si bé la mesura del grau d'interacció i, per tant, de la quantitat d'analit en alguns casos es pot fer per detecció directa, sovint l'enllaç Ag-Ab no incideix en cap propietat mesurable pel transductor i aleshores cal recórrer a estratègies de detecció indirecta. En aquests casos cal emprar algun tipus de *marcatge* (enzimàtic, isòtops radioactius, grups acolorits, grups fluorescents, nanopartícules,...)^{18,19,20} que provoqui el canvi d'alguna propietat detectable pel transductor com a conseqüència de la interacció Ag-Ab. El marcatge enzimàtic és la tècnica més emprada actualment car l'activitat catalítica, d'altra banda absent a les espècies immunològiques, a més de provocar canvis detectables pel transductor, té la capacitat d'amplificar el senyal. A més, l'ús d'enzims comporta un altre avantatge, atès que evita haver de treballar amb isòtops radioactius, propis de la tècnica RIA (radioimmunoassaig), àmpliament emprada fins a l'inici del desenvolupament del marcatge enzimàtic.

1.1.2.3 Oligonucleòtids

Els *oligonucleòtids* o *àcids nucleics de cadena curta* estan formats per dues cadenes simples de *nucleòtids* que es complementen. La complementarietat prové de les interaccions que s'estableixen entre les *bases nitrogenades* que formen cada un dels nucleòtids. Una aplicació pràctica dels oligonucleòtids com a elements de reconeixement amb finalitats analítiques són els *genosensors*

Els genosensors o *sensors d'ADN* (*àcid desoxiribonucleic*) es fonamenten en el mètode d'hibridació de l'ADN, de manera que tenen immobilitzada una *sonda d'ADN* (seqüència de la cadena simple d'un gen), com a element de reconeixement biològic, amb la finalitat d'aprofitar la selectivitat implícita a la complementarietat dels parells de bases nitrogenades.²¹ Així, quan la mostra conté la seqüència de nucleòtids complementària a la sonda d'ADN immobilitzada, es forma l'hibrid (doble cadena) corresponent, que es detecta directament per mètodes òptics (SPR) o piezoelèctrics o, el que és més habitual, indirectament mitjançant algun tipus de marcatge, de la mateixa forma que es procedia amb els immunosensors.

1.1.2.4 Receptors químics

Els *receptors químics* són proteïnes que posseeixen propietats de reconeixement molecular vers determinats compostos químics, com ara hormones o transmissors neuroquímics. Com a resultat de la seva interacció específica amb aquest tipus de compostos, els receptors moleculars experimenten canvis conformacionals que provoquen l'inici d'una resposta en cadena que amplifica el senyal que es mesura.

Malgrat la reversibilitat de l'enllaç entre l'analit i el receptor i l'elevada especificitat d'aquesta interacció, l'ús dels receptors moleculars com a elements de reconeixement en biosensors s'ha vist fins ara limitat pels avenços de la biologia molecular. Això és degut a la dificultat d'aïllar aquests receptors de les membranes lipídiques en quantitats i puresa suficients²² per ésser aplicats amb fins analítics.

Darrerament s'estan utilitzant, com a bioreceptors, nous materials que simulen reconeixements moleculars propis de la naturalesa, anomenats materials *biomimètics*. Aquests materials representen un important avantatge en front del material biològic, atès que no presenten les característiques d'inestabilitat pròpies d'aquests, alhora que són més fàcils de manipular i redueixen en gran mesura els costos de producció dels sensors que els incorporen.^{23,24}

1.2 BIOSENSORS ENZIMÀTICS

L'alt grau de selectivitat implícit a les interaccions enzim-substrat, juntament amb la sensibilitat pròpia de les reaccions enzimàtiques, ha estat la base del desenvolupament dels biosensors i la seva aplicació en camps com el medi ambient, les diagnòs clíniques, la biotecnologia o el control de processos.²⁵ El primer biosensor es va construir l'any 1962²⁶ mitjançant l'aplicació d'una membrana enzimàtica sobre el primer sensor desenvolupat que mesurava la concentració d'oxigen en sang.

A l'hora de dissenyar un biosensor enzimàtic cal tenir molt clara la seva futura aplicació, ja que d'això dependrà l'elecció del sistema de reconeixement enzimàtic i del transductor que millor s'adapti a aquest. Pel que fa al sistema de reconeixement s'ha de buscar una reacció enzimàtica que impliqui, directament o indirecta, l'analit que es vol determinar. Aquesta reacció enzimàtica ha d'anar lligada a una estratègia d'ús que és el que permet relacionar la concentració d'analit amb una propietat mesurable pel transductor. D'altra banda, el tipus de transductor escollit depèn en cada cas de les propietats mesurables que posseeixen les espècies implicades a la reacció enzimàtica. Així, per exemple, els biosensors que incorporen enzims del grup de les *oxidoreductases*, habitualment estan relacionats amb processos de transducció electroquímica. En aquest cas s'aprofita la transferència electrònica pròpia que té lloc entre el centre actiu de l'enzim i el substrat, a fi de donar un senyal de tipus elèctric que es pot relacionar directament amb la concentració d'analit a la mostra. De fet, el senyal mesurat en aquests casos pot ésser resultat de la transferència electrònica que té lloc entre la superfície electròica i una de les espècies implicades a la reacció enzimàtica (Figura 1.3(A)), o bé

directament amb el centre actiu de l'enzim (Figura 1.3(B)). Aquest darrer model exemplifica el procés de *bioelectrocatalísi*, que es fonamenta en l'obtenció de canvis de tipus elèctric al transductor que s'originen com a resultat del procés biocatalític en què participa l'enzim.²⁷ És a dir, com a resultat de la reacció enzimàtica, el consum de substrat o la formació de productes genera canvis de potencial, d'intensitat de corrent o d'alguna altra propietat elèctrica del transductor, que s'empren com a mesura del procés biològic que té lloc.

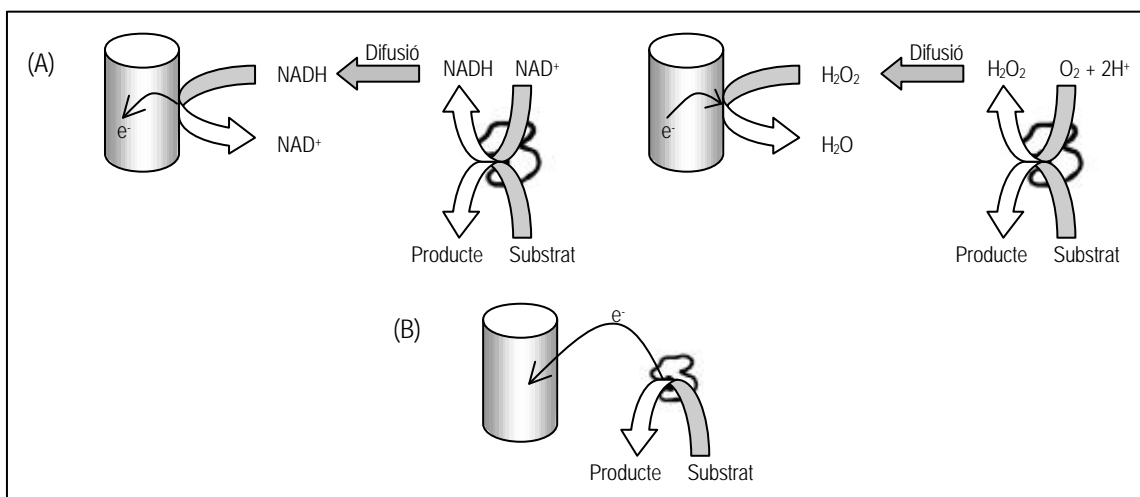


Figura 1.3: (A) Oxidació electroquímica del cofactor NADH i reducció electroquímica del peròxid d'hidrogen, obtinguts dels corresponents processos redox biocatalitzats dels substrats dels enzims deshidrogenases i oxidases respectivament emprats. (B) Procés de bioelectrocatalísi.

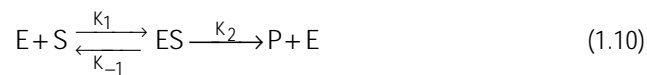
En aquest context, és possible classificar els biosensors en 3 generacions diferents segons el mecanisme d'acoblament electrònic existent entre els enzims *redox* i els elèctrodes. Quan la transferència electrònica que ha d'originar el senyal a mesurar es basa en la detecció electroquímica del substrat enzimàtic o d'algun dels productes formats, hom parla de *biosensors de primera generació*. Si la transferència electrònica requereix a més d'una espècie electroactiva que actuï de pont entre el substrat o el producte enzimàtic i el transductor, com seria el cas dels *mediadors d'oxidació-reducció* que es tractaran en detall a § 1.3.1.3, aleshores hom parla de *biosensors de segona generació*. Per últim, hom descriu els *biosensors de tercera generació* com aquells basats en una transferència electrònica directa entre el transductor i els enzims electroquímicament actius, és a dir, en processos de bioelectrocatalísi.²⁸ Aquesta darrera classe de biosensors s'ha vist beneficiada per la possibilitat de modular les propietats finals dels dispositius resultants, que han d'afavorir la transferència electrònica directa, a través de modificacions de l'enzim mitjançant tècniques d'enginyeria genètica o química,^{29,30,31,32,33} o amb les noves tecnologies adreçades al disseny d'interfases^{34,35}.

1.2.1 ESTRATÈGIES D'ÚS DELS BIOSENSORS ENZIMÀTICS

Si bé l'especificitat dels enzims vers el seu substrat és la característica que els fa adequats per ésser emprats amb finalitats analítiques, la sensibilitat que permeten assolir a les tècniques que els utilitzen és un paràmetre molt important a tenir en compte.

Aquesta sensibilitat està directament relacionada amb l'afinitat de l'enzim pel substrat i amb la velocitat amb què el complex enzim-substrat evoluciona per donar el producte de la reacció, és a dir, depèn de l'activitat catalítica desenvolupada. Aquests factors es poden quantificar a partir dels valors de les constants que se'n deriven de l'anàlisi de Michaelis i Menten sobre la cinètica de les reaccions enzimàtiques. Així, conèixer els fonaments teòrics bàsics d'aquest tipus de reaccions permet extreure la màxima informació a l'hora de dissenyar una estratègia d'ús dels biosensors enzimàtics.

Inicialment, es planteja el següent mecanisme per a una reacció catalitzada per un enzim en solució que només implica un substrat:



on E és l'enzim, S el substrat, ES el complex intermedi enzim-substrat, P el producte, K_1 i K_{-1} la constant cinètica de formació del complex intermedi enzim-substrat i la seva inversa, respectivament, i K_2 la constant cinètica de formació del producte. Aleshores, mitjançant una sèrie de tractaments matemàtics, que consisteixen en l'aplicació de la *teoria de l'estat estacionari* a les reaccions enzimàtiques, s'obté la següent expressió que relaciona la velocitat de formació del producte amb la concentració inicial de substrat i la concentració d'enzim en solució:

$$v = \frac{K_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]} \quad (1.11)$$

on K_M és la constant de Michaelis, que ve donada per:

$$K_M = \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1} \quad (1.12)$$

El valor de K_M , que es pot determinar experimentalment com la concentració de substrat en què la velocitat és la meitat de la velocitat màxima,³⁶ dona idea de l'afinitat d'un enzim pel seu substrat. D'aquesta forma, si K_M té un valor petit, vol dir que $K_1 \gg K_{-1} + K_2$ i, per tant, l'enzim té molta afinitat pel substrat.¹⁵

Malgrat que tot aquest tractament s'aplica en condicions en què l'enzim està en solució, el principal repte en el desenvolupament de biosensors enzimàtics és fer un disseny que aconseguixi reproduir els valors de K_M i K_2 , propis dels enzims en solució, en les condicions en què es troben els enzims quan s'implementen a un biosensor.³⁷

Així, en un biosensor, de la mateixa manera que quan l'enzim es troba en solució, l'evolució de la velocitat d'una reacció enzimàtica en funció de la concentració de substrat segueix el comportament marcat per l'equació (1.11), que per a una quantitat d'enzim constant presenta una resposta com la que es pot veure a la Figura 1.4. S'ha de tenir present que el senyal mesurat amb aquest tipus de sensors és proporcional a la velocitat de reacció, atès que com més ràpida és la reacció més varia la concentració de l'espècie que s'està fent el seguiment.

En aquesta representació de la velocitat enfront de la concentració de substrat, s'observen dues zones ben diferenciades. Una primera zona on la velocitat varia linealment amb la concentració de substrat ($[S] \ll K_M$, essent útil per a la determinació de substrat) i una segona zona en què la velocitat és independent de la concentració ($[S] \gg K_M$, essent útil per a la determinació d'enzim). L'ús d'unes condicions o altres definirà l'estratègia a seguir i l'anàlit a determinar.

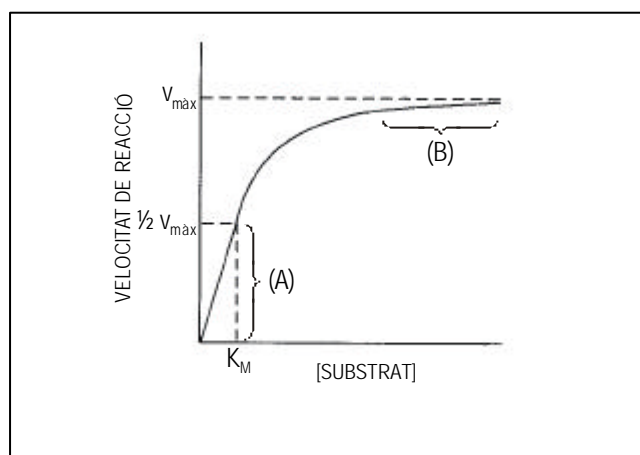


Figura 1.4: Resposta enzimàtica, basada en la dependència de la velocitat de reacció amb la concentració de substrat, que s'ajusta a la cinètica proposada per Michaelis i Menten. K_M és la constant de Michaelis-Menten. La regió (A), on es compleix que $S \ll K_M$, és útil per a la determinació de substrat. En canvi, quan l'anàlit és l'enzim, sovint s'ha de treballar a la regió (B), on $S \gg K_M$.

1.2.1.1 Determinació d'anàlits mitjançant la mesura de l'activitat catalítica

Si el que es vol determinar és la concentració d'alguna de les espècies presents a la mostra, implicades a la reacció enzimàtica, es mesura l'activitat catalítica amb què l'enzim transforma el substrat en producte. En aquests casos, habitualment es treballa a la regió corresponent a $[S] \ll K_M$, on la velocitat depèn linealment de la concentració de substrat. Ara bé, en alguns casos concrets, s'haurà de treballar en condicions de substrat en excés.

La mesura pot ser directa, quan es basa en el canvi d'alguna propietat relacionada amb les espècies directament implicades a la reacció enzimàtica, o bé indirecta, si l'analit no intervé directament a la reacció de catalisi enzimàtica.

Mesurament directe

En aquests casos, com ja s'ha dit, la mesura està directament relacionada amb les espècies que intervenen en la reacció enzimàtica.

D'una banda, si es parteix d'una reacció enzimàtica simple, com la vista anteriorment, en què només participa un substrat per donar un producte, la mesura de l'activitat enzimàtica és funció de la velocitat de desaparició del substrat o de formació del producte, segons quina de les dues espècies provoqui canvis en la propietat mesurable.

D'altra banda, hi ha enzims que a fi d'assolir la seva màxima eficiència en el procés de catalisi enzimàtica necessiten la presència d'una molècula orgànica no proteica que s'anomena cofactor. El cofactor pot trobar-se enllaçat a l'enzim (per exemple, el FAD) i aleshores es tracta del grup prostètic de l'enzim, o bé pot ser que s'hagi d'afegir al medi de reacció (per exemple, el NADH). En ambdós casos, la mesura de la velocitat de la reacció enzimàtica es pot relacionar amb el canvi d'alguna propietat inherent al propi cofactor, que pot ser detectat pel transductor i que servirà, per tant, per obtenir informació sobre l'activitat catalítica de l'enzim i, en darrer terme, sobre la concentració d'analit a la mostra.

En resum, la mesura de l'analit es pot fer de forma directa quan el substrat, el producte o el cofactor de la reacció enzimàtica que té lloc provoquen canvis en alguna propietat mesurable.

Mesurament indirecte

L'activitat catalítica d'un enzim es pot veure afectada per petits canvis en l'estabilitat de l'enzim. Per això, cal assegurar unes condicions de treball constants, que variïn molt poc durant l'anàlisi i que siguin el més semblants possible a les condicions en què es troba l'enzim *in vivo*. Un cop s'aconsegueix establir unes condicions òptimes de treball, l'activitat catalítica també pot ésser modificada per la presència de certs components que actuen com a *activadors* o com a *inhibidors*. Quan l'analit és una espècie que actua com a activador o com a inhibidor, s'ha de fer la mesura de forma indirecta. En aquests casos, la mesura es basa en comparar l'activitat catalítica en absència o en presència de determinades espècies que afecten al valor d'aquest paràmetre. És per això que s'ha de conèixer quin mecanisme es segueix a fi de saber si convé treballar amb condicions de $[S] \ll K_M$, o bé de $[S] \gg K_M$. Aquesta segona opció és l'escollida en els casos en què el valor de la velocitat màxima varia amb la presència o l'absència de determinades espècies.

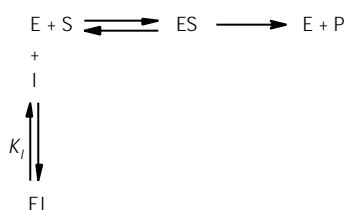
Algunes reaccions enzimàtiques es veuen afavorides com a conseqüència de la redistribució òptima de densitat electrònica que s'obté com a resultat de la interacció de certs ions metàl·lics amb l'enzim o amb el complex enzim-substrat. En aquests casos l'analit actua com a activador, ja que augmenta

l'activitat catalítica. D'altra banda, de vegades la interacció d'una espècie determinada amb l'enzim pot resultar contraproductent, de manera que l'avenç de la reacció enzimàtica es veu impedit i, per tant, l'activitat catalítica disminueix. Aleshores, l'analit actua com a inhibidor.^{38,39,40} En ambdós casos, la concentració d'analit es pot mesurar, com en l'apartat anterior, a partir del canvi d'alguna propietat d'una de les espècies implicades directament a la reacció enzimàtica, ja sigui el substrat, el producte o el cofactor.

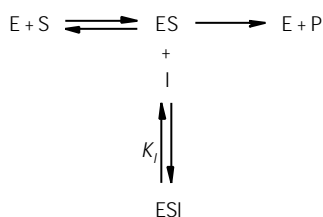
La inhibició enzimàtica és força emprada en el disseny de biosensors enzimàtics amb finalitats mediambientals, atès que sovint els contaminants actuen com a inhibidors enzimàtics.^{41,42,43,44} A més, cal destacar l'elevada sensibilitat que poden assolir els dispositius basats en inhibició enzimàtica, degut a què la quantitat d'enzim a un biosensor acostuma a ésser molt petita i, per tant, petites quantitats d'inhibidor (nM o μ M) poden provocar canvis importants en l'activitat catalítica global.^{45,46,47}

La inhibició enzimàtica es pot classificar com a reversible o irreversible, segons si l'eliminació de l'inhibidor del medi comporta una recuperació espontània de l'activitat catalítica o, ans al contrari, és necessària la utilització d'una reacció química per dur a terme la reactivació de l'enzim. Alhora, la inhibició reversible es pot subdividir en inhibició *competitiva*, *acompetitiva* i *no competitiva*.⁴⁸

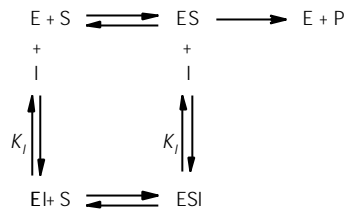
La ***inhibició competitiva*** es dona quan l'inhibidor i el substrat competeixen ambdós pel mateix seti actiu. Això s'observa amb la disminució del grau d'inhibició a mesura que augmenta la concentració de substrat. En aquests casos es treballa en condicions de $[S] \ll K_M$, ja que el paràmetre afectat per la presència de l'inhibidor és la K_M , mentre que la velocitat màxima resta constant.



En canvi, la ***inhibició acompetitiva*** fa referència a aquells casos en què l'inhibidor no reacciona amb l'enzim, sinó que únicament ho fa amb el complex enzim-substrat. Com a resultat, el producte obtingut és diferent al producte de la reacció enzimàtica normal. La característica pròpia d'aquestes situacions és que el grau d'inhibició augmenta amb l'increment de la concentració de substrat. Per tant, atès que la presència d'inhibidors provoca una disminució dels valors de K_M i de la velocitat màxima, quan la inhibició és acompetitiva es pot treballar en tot el rang de concentracions de substrat.



Finalment, la **inhibició no competitiva** té lloc quan l'inhibidor reacciona amb el substrat i amb el complex enzim-substrat i, per tant, dificulta la producció del producte de la reacció enzimàtica de l'enzim amb el seu substrat corresponent. D'aquesta forma, el grau d'inhibició resulta ésser independent de la concentració de substrat. Aquest fet implica que en aquest tipus d'ocasions s'ha de treballar en condicions de $[S] \gg K_M$, ja que l'únic paràmetre afectat resulta ésser la velocitat màxima.



En el cas de la **inhibició irreversible**, s'ha d'esmentar que inclou inhibidors com els metalls pesants o alguns pesticides, espècies que afecten irreversiblement l'activitat enzimàtica.⁴⁹

1.2.1.2 Determinació de l'enzim com a analit

Quan el que es vol conèixer és la quantitat d'enzim present a una mostra, s'ha de treballar a la regió corresponent a $[S] \gg K_M$. En aquesta regió, la velocitat és independent de la concentració de substrat i el seu valor correspon al valor màxim (v_{\max}) que s'obté per a una quantitat d'enzim fixa quan el substrat està en excés, és a dir, en aquestes condicions es pot establir una relació lineal entre el valor de v_{\max} i la quantitat d'enzim.

Aquesta estratègia d'ús dels biosensors enzimàtics que emprava l'enzim com a analit, sovint s'utilitza com a sistema de detecció en casos de marcatge enzimàtic. Així per exemple quan es treballa amb immunosensors, la quantitat d'enzim present a la superfície del biosensor està relacionada, directament o indirecta, amb la concentració d'espècie que es vol determinar.

1.2.2 ESTRATÈGIES D'IMMOBILITZACIÓ

El mot proteïna prové del nom grec *Proteu*, déu de la mitologia grega que posseïa el do de canviar de forma quan volia fugir d'aquells que el perseguïen, i respon a la propietat de les proteïnes de modificar la seva conformació davant de petites alteracions de les condicions del medi on es troben.

L'estructura proteica d'un enzim és sensible a petits canvis de pH, temperatura o pressió, a l'exposició a radiacions de l'ultraviolat-visible, a detergents, solvents orgànics o certes substàncies químiques, etc.

Aquestes alteracions de l'estructura proteica provoquen canvis conformacionals que poden implicar modificacions de la disposició espacial dels aminoàcids involucrats al seti actiu, afectant l'activitat catalítica de l'enzim i la seva especificitat pel substrat. Aquest procés en el qual l'enzim perd part de la

seva activitat enzimàtica com a resultat de pertorbacions i disrupcions irreversibles de les seves estructures secundària, terciària i quaternària, es coneix com a *desnaturalització*.¹⁵

Atès que l'estabilitat de l'enzim és un punt clau en el bon funcionament d'un biosensor enzimàtic, queda clar que s'ha d'intentar mantenir constants les condicions òptimes de pH, temperatura i força iònica característiques de cada enzim. Ara bé, això es dificulta quan l'enzim es troba immobilitzat sobre una superfície, ja que en aquestes circumstàncies, l'ambient que l'envolta ja no és l'òptim, de manera que el comportament enzimàtic esdevé afectat. Així, com a resultat de la immobilització enzimàtica, l'enzim experimenta un cert grau de desnaturalització, que cal afegir al fet que durant aquest procés les molècules d'enzim s'orienten aleatòriament i, per tant, alguns centres actius poden quedar bloquejats o amagats, provocant una disminució important de l'activitat catalítica de l'enzim. Com a conseqüència, les condicions que caracteritzen l'ambient final que envolta l'enzim, i que són responsables de la seva estabilitat, representen un punt crucial en el bon desenvolupament d'un biosensor enzimàtic. És per tot això que les estratègies d'immobilització mereixen ésser tractades amb deteniment, atès que el comportament dels biosensors enzimàtics depèn en gran mesura del microambient, assolit durant el procés d'immobilització, en què es troba finalment l'enzim.

Atesa la importància de les estratègies d'immobilització, aquest és un camp de desenvolupament continu adreçat a augmentar l'estabilitat química de l'enzim immobilitzat, a fi que es pugui mantenir l'activitat catalítica durant un llarg període de temps i, per tant, sigui possible l'ús continuat dels biosensors enzimàtics. Aquesta reutilització de l'enzim comporta una reducció del cost d'anàlisi i compleix així amb un dels requisits dels sensors.

Malgrat el nombre creixent de protocols, les tècniques generals d'immobilització d'enzims a la superfície dels sensors es poden incloure dins de la següent classificació:

- ✓ *Retenció* de l'enzim en solució mitjançant una *membrana inert*.^{50,51}
- ✓ *Adsorció*.^{52,53}
- ✓ *Atrapament* o *copolimerització* a l'interior d'una *matriu polimèrica*.^{54,55}
- ✓ *Atrapament* a l'interior d'una *membrana lipídica*.
- ✓ *Entrecreuament* mitjançant l'ús d'*agents bifuncionals reticulants*.^{56,57}
- ✓ Formació d'*enllaços covalents* amb la superfície activada del transductor.^{58,59}
- ✓ *Interaccions electrostàtiques* amb la superfície modificada del transductor.
- ✓ *Interaccions d'afinitat* amb la superfície modificada del transductor.^{60,61}

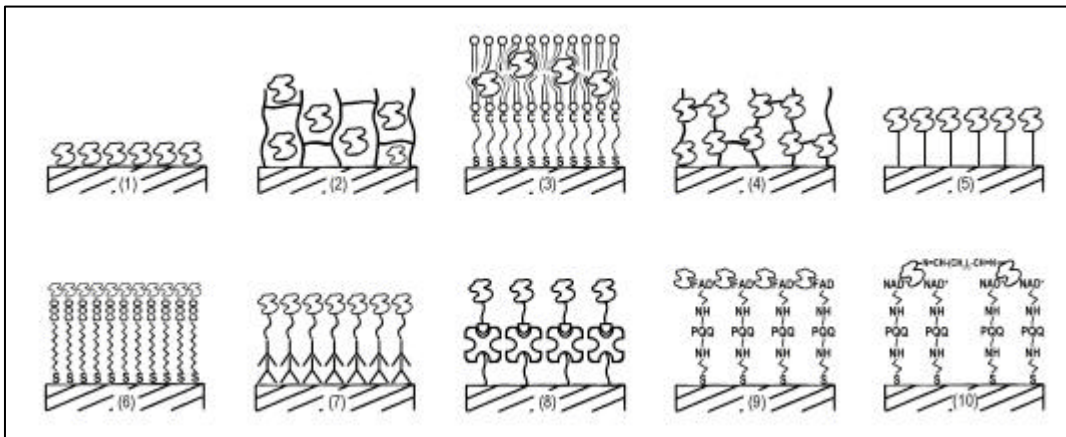


Figura 1.5: Immobilització d'enzims sobre la superfície d'un transductor mitjançant diferents tècniques: (1) adsorció, (2) atrapament o copolimerització a l'interior d'una matriu polimèrica, (3) atrapament a l'interior d'una membrana lipídica, (4) entrecreuament mitjançant l'ús d'agents bifuncionals reticulants, (5) formació d'enllaços covalents entre l'enzim i la superfície activada del transductor, (6) interaccions electrostàtiques entre l'enzim i la superfície activada del transductor mitjançant una monocapa de grups tiol, (7) interaccions d'afinitat antigen-anticòs amb la superfície modificada del transductor amb una monocapa d'anticòssos, (8) interaccions d'afinitat biotina-avidina amb la superfície modificada del transductor amb una monocapa d'avidina, (9) reconstitució d'apo-enzims sobre la superfície modificada del transductor mitjançant una monocapa de PQQ-FAD i (10) entrecreuament entre el complex d'afinitat format entre l'enzim i una monocapa de PQQ-NAD⁺.

Retenció de l'enzim en solució mitjançant una membrana inert

Els enzims són proteïnes de massa molecular elevada i de dimensions relativament grans, propietats que els fan aptes per ésser retinguts amb una membrana inert. Aquesta membrana inert pot ésser, per exemple, una membrana de diàlisi d'acetat de cel·lulosa, que confinarà l'enzim a l'espai que queda entre la superfície del transductor i la pròpia membrana.

La membrana ha de posseir les característiques adequades per adherir-se correctament a la superfície del transductor i alhora donar protecció a l'enzim. No obstant això, ha d'ésser permeable al pas de les espècies que intervenen a la reacció. En alguns casos aquesta permeabilitat es pot dur a terme de forma selectiva, mitjançant la porositat i el caràcter hidrofòbic o hidrofílic de la membrana.

Si bé es pot dir que l'enzim està en certa manera immobilitzat, és evident que continua estant en solució (tot i que confinat a un espai), la qual cosa implica que la seva cinètica enzimàtica és igual a la que s'obté en els assaigs enzimàtics convencionals, atès que no ha experimentat cap canvi en el seu entorn i, per tant, la seva activitat enzimàtica no s'ha vist alterada.

Malgrat aquests avantatges, el fet de tenir l'enzim en solució comporta una pèrdua continuada de la seva activitat enzimàtica. A més, cal afegir que el tractament manual implícit en aquest tipus d'immobilitzacions dificulta la producció massiva, alhora que porta associat un grau d'irreproductibilitat

que fa que els biosensors enzimàtics, amb retenció de l'enzim mitjançant una membrana inert, només siguin útils en assaigs molt concrets.

Adsorció

Com l'anterior, aquesta és una tècnica d'immobilització física. L'adsorció es basa en la propietat que posseeixen les macromolècules, com és el cas dels enzims, de quedar adsorbides sobre la superfície de metalls, òxids de metalls, plàstic, grafit o vidre porós, materials sobre els quals s'acostuma a immobilitzar les espècies de reconeixement.

Malgrat que el procés d'immobilització per adsorció és ràpid i senzill, les forces que mantenen l'enzim en contacte directe amb la superfície del transductor són febles, essent habitualment forces de Van der Waals i en ocasions ponts d'hidrogen. Això representa un inconvenient, atès que petits canvis en les condicions de treball poden provocar desorcions de l'enzim, la qual cosa implica una pèrdua de l'estabilitat dels biosensors enzimàtics. Per tant, l'adsorció s'utilitza sovint per fer estudis preliminars, o bé per construir biosensors d'un sol ús, és a dir, en casos en què no es requereix una estabilitat del biosensor durant un llarg període de temps.

Atrapatament o copolimerització a l'interior d'una matriu polimèrica

L'enzim pot ésser atrapat a l'interior d'una matriu polimèrica inert, que només servirà com a estructura, o bé pot quedar retingut a l'interior d'un polímer format a partir de monòmers funcionalitzats.

Per una banda, l'enzim acostuma a trobar-se en un medi favorable, atès que, per exemple, els gels que actuen de matriu contenen aigua i, per tant, mantenen el grau d'hidratació necessari pel correcte funcionament de l'enzim. Ara bé, pot haver-hi una pèrdua d'enzim a través dels porus de la matriu, que es pot reduir amb l'addició d'un agent reticulant al medi on té lloc la polimerització. El polímer inert més utilitzat en l'atrapament físic d'enzims és la *poliacrilamida*.

Per altra banda, la polimerització en presència d'enzim es pot fer a partir de monòmers funcionalitzats i, aleshores, el polímer, a més de fer de matriu, participa en d'altres tasques. Un cas concret és l'*electropolimerització*^{62,63} de polímers conductors (polipirrol, polianilina,...) en biosensors amperomètrics. Aquests, a més de retenir l'enzim, faciliten la transferència electrònica entre el centre actiu de l'enzim i la superfície del transductor. Alguns d'aquests polímers poden actuar com a espècies redox (mediadors d'oxidació-reducció), tal com es veurà a § 1.3.1, capaces de disminuir el potencial de treball, fet que permet reduir el nombre d'interferències.

Aquesta darrera tècnica presenta l'avantatge de poder formar capes polimèriques de gruix controlat i, per tant, millora les característiques de reproductibilitat. No obstant això, en alguns casos la membrana polimèrica dificulta la difusió de les espècies implicades a la reacció enzimàtica, fet que provoca un augment del temps de resposta. Per això, cal buscar estratègies que permetin obtenir membranes de poc gruix.

Una alternativa a aquest tipus de matrius polimèriques consisteix en incorporar l'enzim a una matriu polimèrica anomenada *compòsit*.⁶⁴ Aquest material està format per una dispersió de petites partícules d'un sòlid conductor (grafit, platí,...) en una matriu polimèrica aïllant (oli de parafina, resines epòxiques, metacrilat de metil,...).^{65,66,67} Com a resultat de la incorporació de l'enzim al compòsit s'obté un *biocompòsit*, que es caracteritza per tenir l'enzim atrapat a l'interior de la matriu, de manera que a la superfície hi ha molècules d'enzim ancorades, algunes d'elles amb el seti actiu exposat i, per tant, susceptibles de donar lloc a la reacció enzimàtica. L'avantatge implícit dels biocompòsits és que actuen com a reservoris enzimàtics i, per tant, el poliment de la superfície permet exposar enzim fresc a l'exterior. Si s'aconsegueix una bona homogeneïtzació durant el procés de mescla dels components que han de formar el biocompòsit, es pot assolir un nivell molt alt de reproductibilitat. A tot això cal afegir l'estabilitat típica que presenten aquests biocompòsits i la versatilitat que ofereixen, atesa la gran varietat de molècules que es poden incorporar a la matriu polimèrica.

Atrapament a l'interior d'una membrana lipídica

Alguns enzims amb caràcter hidrofòbic, com per exemple l'enzim *piruvat quinasa*, poden ésser immobilitzats mitjançant el seu atrapament a l'interior d'una capa lipídica dipositada sobre la superfície electròdica, sempre que aquesta membrana estigui en contacte amb un medi aquós. La deposició de lípids sobre la superfície hidrofílica de l'electrode es pot dur a terme amb la tècnica de *Langmuir-Blodgett*⁶⁸, o bé mitjançant la *fusió de liposomes*⁶⁹. Aquesta estratègia representa una important millora en l'estabilitat de l'enzim immobilitzat, atès que aquest es troba a un medi de característiques molt similars a les que l'enzim troba *in vivo*. No obstant això, aquesta tècnica es troba estrictament limitada a enzims que posseïxin dominis fortament hidrofòbics, car la presència de grups polars pot suposar la pèrdua significativa per dissolució d'una part important de la quantitat d'enzim present a la membrana.

Entrecreuament mitjançant l'ús d'agents bifuncionals reticulants

Aquesta tècnica es basa en l'atrapament físic de l'enzim que té lloc quan aquest es fa reaccionar químicament amb un agent bifuncional, que habitualment és el *glutaraldehyd*.⁷⁰ Aquest reactiu posseïx dos grups carbonil terminals, que poden reaccionar amb grups amino de les proteïnes per donar agregats insolubles de massa molecular elevada, la qual cosa afavoreix la retenció de l'enzim a l'interior de la matriu reticulada que s'ha format, o bé la seva adsorció sobre una superfície polimèrica.

Durant el procés d'entrecreuament, la conformació de l'enzim pot resultar afectada i, per tant, l'activitat enzimàtica pot experimentar una disminució. Per això, sovint es coimmobilitza una proteïna inert, per exemple la *proteïna de sèrum boví* (BSA), a fi de reduir la possibilitat de formació d'enllaços entre el glutaraldehyd i un grup funcional del seti actiu de l'enzim, i alhora mantenir les propietats mecàniques de la membrana.

Si bé l'entrecreuament millora l'estabilitat de l'enzim i, com a conseqüència, allarga el temps de vida del biosensor enzimàtic, les capes formades acostumen a ésser gruixudes, fet que dificulta la difusió de les

espècies a través d'aquestes i, per tant, malgrat que poden tenir un contingut enzimàtic elevat, l'activitat esdevé reduïda.

Formació d'enllaços covalents amb la superfície activada del transductor

Aquesta tècnica d'immobilització consisteix en formar enllaços covalents entre la superfície del transductor, prèviament activada, i grups funcionals (amino, hidroxil, tiol,...) de les cadenes laterals dels aminoàcids de l'enzim que no es troben implicats en l'activitat catalítica.

La immobilització mitjançant la formació d'enllaços covalents és convenient en aquells casos en què es necessita una estabilitat de l'enzim durant un llarg període de temps, atès que les pèrdues de material proteic són mínimes, fins i tot sota condicions de flux continu, agitació,... Ara bé, posseeix l'inconvenient d'ésser un procés laboriós i tediós, a més d'estar sotmès al risc que suposa perdre activitat enzimàtica com a conseqüència del bloqueig de setis actius durant la formació d'enllaços. Aquest darrer aspecte es pot tractar de minimitzar mitjançant l'addició de substrat al medi durant el procés d'immobilització, amb la finalitat de bloquejar els setis actius perquè no puguin participar en la formació d'enllaços.

Interaccions electrostàtiques amb la superfície modificada del transductor

Aquesta estratègia aprofita les interaccions electrostàtiques entre proteïnes i la superfície activada del transductor, en combinació amb l'adherència hidrofílica addicional que habitualment té lloc. D'aquesta manera s'origina una adsorció irreversible amb l'alineament de monocapes de proteïna que mostren grups carboxil terminals. Un exemple és el proposat per *Tarlov et al.*⁷¹, basat en la formació d'una monocapa d'àcid 16-sulfanilhexadecanoic sobre un transductor d'or, en què s'adsorbeix *citocrom c*. Aquest tipus d'immobilització aconsegueix distàncies molt petites entre el seti actiu de l'enzim i la superfície electròdica, fet que assegura una transferència electrònica ràpida entre ambdós.

Interaccions d'afinitat amb la superfície modificada del transductor

Les interaccions per afinitat entre *antigen-anticòs*,⁷² *biotina-avidina*⁷³ o algunes *glicoproteïnes* i les respectives *lectines*⁷⁴, es caracteritzen per mostrar constants d'associació molt elevades. Aquesta propietat fa possible l'ús d'aquestes interaccions de reconeixement específic per a poder formar monocapes o multicapes de proteïna molt estables sobre la superfície del transductor, amb un control exhaustiu de la seva ordenació i estructura final. Un altre cas d'interaccions específiques és el que es dona entre cofactors i els enzims que els requereixen, que ha permès la immobilització d'enzims redox sobre la superfície de diversos elèctrodes. Els cofactors modificats s'enllacen covalentment al transductor i en presència de l'enzim interaccionen amb aquest per afinitat. Els cofactors *flavin adenin dinucleòtid fosfat* (FAD) i *pirroloquinolin quinona* (PQQ), permeten la reconstitució de l'*apoenzim* com a resultat de la seva interacció. En canvi, altres cofactors com el *nicotin adenin dinucleòtid* (NAD⁺) i el *nicotin adenin dinucleòtid fosfat* (NADP⁺) formen complexos d'afinitat temporals i, per tant, s'han de controlar acuradament les condicions de treball per forçar els equilibris en el sentit del complex i així evitar les pèrdues d'enzim quan l'enzim se separa del seu cofactor.⁷⁵

L'elecció d'una determinada estratègia d'immobilització enzimàtica depèn de diversos factors, tots ells lligats a mantenir constants l'activitat catalítica i la cinètica implicada en la reacció enzimàtica, és a dir, s'ha de buscar la mínima alteració possible de l'enzim.¹⁰

El primer d'aquests factors està estretament relacionat amb la naturalesa de l'enzim, això vol dir, amb les seves característiques estructurals, que impliquen propietats com la dimensió o la polaritat de certs dominis, i amb la presència i accessibilitat de certs grups funcionals. En aquest sentit, com ja es va comentar a § 1.1.2.1, existeix la possibilitat d'immobilitzar cèl·lules, teixits o microorganismes que mantenen l'enzim en el seu àmbit natural, la qual cosa els fa més eficients, ja que no han experimentat cap tractament i, per tant, cap alteració. Ara bé, en aquests casos, la selectivitat es veu reduïda, degut a la presència de diversos enzims, alguns dels quals poden competir pel mateix substrat.

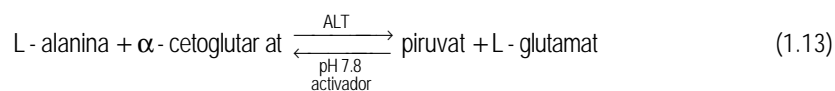
A l'hora de prendre una decisió, també són importants el tipus de transductor i el coneixement de les condicions de treball a què estarà sotmès el biosensor enzimàtic.

Però potser un dels factors més importants, que sovint dicta l'estratègia a escollir, es fonamenta en el coneixement de les condicions d'emmagatzematge a què s'ha de sotmetre el biosensor enzimàtic, ja que aquestes proporcionen una idea del temps durant el qual l'enzim ha de restar estable i de les condicions que haurà de suportar.⁷⁶

1.2.3 SEQÜENCIACIÓ DE REACCIONS ENZIMÀTIQUES

De vegades, l'elecció del millor sistema de reconeixement passa per incorporar més d'un enzim en la configuració del biosensor, a fi de resoldre algun dels següents problemes.

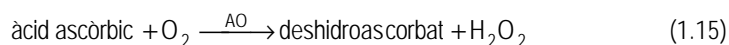
✓ En primer lloc, sovint l'ús de més d'una reacció enzimàtica prové de la necessitat de convertir el producte de la primera reacció en una altra espècie que posseeixi alguna propietat que el faci fàcilment detectable. Per exemple, quan l'enzim *alanina-amino-transferasa* (ALT) és l'anàlit a detectar, cal acoblar a la primera reacció, una segona reacció en què intervé l'enzim *lactat deshidrogenasa* (LDH):



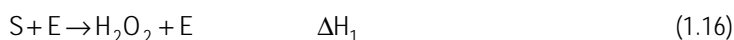
En aquest cas, la presència de l'enzim ALT es pot seguir òpticament, a partir de l'absorbància del cofactor NADH a 340 nm, o bé amperomètricament, en base a l'oxidació del NADH a NAD⁺.

✓ Un altre motiu per incorporar més d'un enzim a un biosensor pot ser per eliminar subproductes o interferències. En aquests casos es pot coimmobilitzar un segon enzim que permeti una reacció paral·lela o seqüencial a fi d'eliminar del medi l'espècie no desitjada. Un exemple pot ésser la

coimmobilització de l'enzim de treball amb l'*ascorbat oxidasa* (AO), dirigida a eliminar l'àcid ascòrbic present als teixits, ja que acostuma a ser una interferència important en mesures de tipus amperomètric:



✓ Finalment, la seqüenciació de reaccions enzimàtiques també s'utilitza per amplificar el senyal obtingut. Per exemple, molts enzims *oxidoreductases* donen lloc a reaccions exotèrmiques, la qual cosa és aprofitada per dur a terme una detecció tèrmica. Una forma d'amplificar aquest senyal pot consistir en acoblar una segona reacció enzimàtica. Si a la primera reacció s'obté com a subproducte peròxid d'hidrogen, es pot coimmobilitzar l'enzim *catalasa*, juntament amb l'enzim responsable de la primera reacció, ja que pot oxidar el peròxid d'hidrogen mitjançant una reacció fortament exotèrmica que amplifica notablement l'augment de temperatura final que es detecta.⁷⁷



$$\Delta H_{\text{tot}} = \Delta H_1 + (-100)\text{KJ/mol} \quad (1.18)$$

Una altra estratègia emprada per millorar la sensibilitat consisteix en regenerar l'espècie detectable mitjançant una segona reacció enzimàtica, amb la finalitat que aquesta torni a estar disponible per iniciar de nou la primera reacció enzimàtica. Un exemple d'això seria l'ús de l'enzim *diaforasa* (Dp) en sistemes en què intervé NADH, atès que en presència d'una espècie redox (*mediador d'oxidació-reducció*) aquest enzim regenera el cofactor, que torna a estar disponible per tornar a intervenir a la reacció enzimàtica inicial.⁷⁸



1.3 MODIFICACIÓ QUÍMICA DE SENSORS ELECTROQUÍMICS

L'elevat grau de sensibilitat i l'ampli interval lineal característics dels sensors amperomètrics ha portat a un ràpid desenvolupament del camp de la recerca d'aquests dispositius, fruit del qual s'ha dissenyat una extensa gamma de sensors amperomètrics amb múltiples aplicacions.

No obstant això, el fet que el potencial aplicat fos l'única variable disponible per controlar la selectivitat a la interfase elèctrode-solució, va suposar una important limitació de l'aplicació d'aquests dispositius.

Com a conseqüència, es van redirigir els esforços dels investigadors cap a resoldre les mancances que se'n derivaven, fet que va donar lloc a l'aparició dels primers *elèctrodes modificats* a finals de la dècada dels 60. Entre els principals objectius que es van imposar com a fita de les modificacions químiques hi havia l'augment de la selectivitat, la protecció de la superfície de l'elèctrode vers l'adsorció de subproductes o de productes de reaccions interferents, l'augment de la velocitat de transferència electrònica mitjançant la reducció del *sobrepotencial* necessari i la millora de l'estabilitat, la sensibilitat i l'ús analític d'aquests sensors.

Les modificacions químiques es basen en alterar químicament la superfície o l'interior (com és el cas de composts i biocompostos) dels elèctrodes. La possibilitat de poder ancorar molècules específiques sobre la superfície d'un elèctrode inert i obtenir així superfícies amb estructures moleculars úniques, cada una adequada a uns interessos analítics concrets, va representar en el seu moment un avenç important en el disseny dels sensors amperomètrics.

Amb els anys, les tècniques utilitzades per modificar el transductor han evolucionat fins al punt que, per exemple, actualment s'aconsegueixen estructures en capes de gruix controlat (des d'uns pocs nm) formades per intrincades xarxes moleculars que atrapen, o bé contenen enllaçades, espècies que permeten un control de la sensibilitat i la selectivitat basat en característiques com les dimensions del porus, la distribució de càrrega o les propietats d'enllaç, a més d'aportar altres beneficis relacionats amb l'afavoriment dels processos de transferència electrònica.

1.3.1 OBJECTIUS DE LES MODIFICACIONS QUÍMIQUES

Com ja s'ha comentat, les modificacions químiques van sorgir com a una estratègia dirigida a resoldre els problemes implícits en l'ús dels sensors amperomètrics. Aquests problemes es poden resumir a grans trets en:⁷⁹

- ✓ la passivació gradual de la superfície de l'elèctrode deguda a l'adsorció de molècules orgàniques grans presents al medi de reacció o d'altres espècies que intervenen en la reacció,
- ✓ la pèrdua de selectivitat a l'hora de discriminar entre soluts que posseeixen característiques redox similars,
- ✓ la cinètica de transferència electrònica lenta que presenten algunes espècies en determinats elèctrodes.

Si bé les modificacions químiques es poden realitzar amb la finalitat d'evitar concretament alguna de les limitacions esmentades, sovint incideixen en més d'una, de manera que aconsegueixen millorar alhora diverses característiques del sensor i, en definitiva, optimitzen el seu ús.

Malgrat que, de la mateixa manera, resulta difícil definir amb claredat els objectius marcats per les modificacions químiques, atès que sovint estan interrelacionats, habitualment es planteja la següent classificació:

1. *Preconcentració* preferencial de l'analit enfront de la resta de components presents a la mostra.
2. *Permeabilitat selectiva* vers determinades espècies.
3. *Electrocatalísi* amb la finalitat d'accelerar les reaccions de transferència electrònica entre l'analit i la superfície de l'elèctrode.

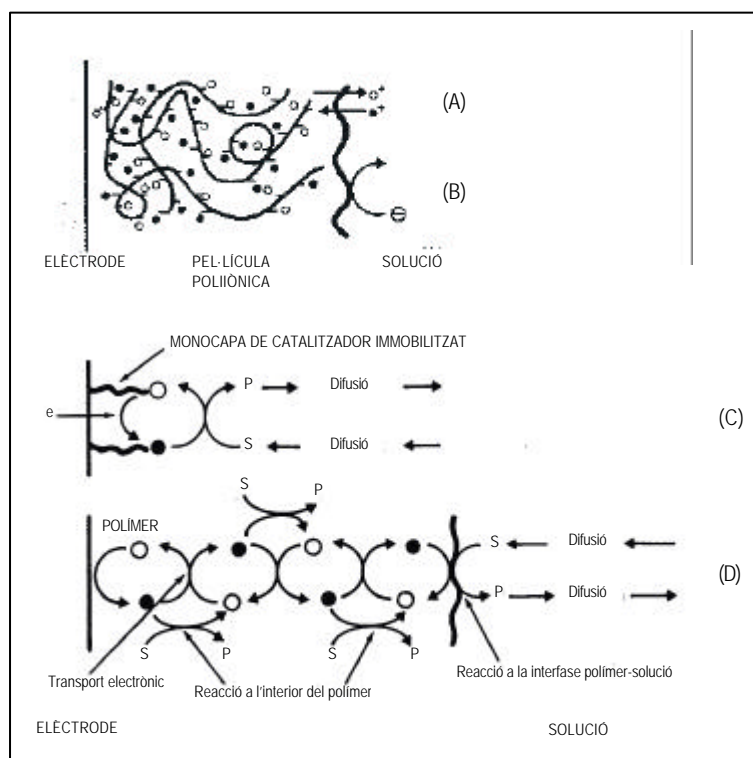


Figura 1.6: Esquemes de modificacions químiques dirigides a processos de: preconcentració d'una determinada espècie catiónica vers altres ions mitjançant un polímer polianiónic (A); permeabilitat selectiva mitjançant una membrana que actua de barrera que impedeix el pas d'anions (B); i electrocatalísi mitjançant una monocapa de catalitzador immobilitzat (C), o bé, una pel·lícula polimèrica amb setes catalítiques (D).

1.3.1.1 Preconcentració

Una de les característiques principals dels sensors és la de simplificar el procés analític, la qual cosa implica que determinats passos, com per exemple la preconcentració de l'analit enfront d'altres espècies presents a la mostra, s'han de dur a terme directament sobre la superfície de l'elèctrode.

Si bé, tradicionalment, l'anàlisi de traces s'acostuma a fer per *redissolució anòdica*, la modificació química dels elèctrodes permet preconcentrar l'analit sense necessitat de què hi hagi pas de corrent,

atès que l'acumulació d'espècies sobre la superfície de l'elèctrode té el seu fonament en *processos físico-químics* com el *bescanvi iònic*, la *complexació* o la *formació de sals insolubles*. Aquesta acumulació d'analit prèvia a la mesura permet augmentar la sensibilitat, alhora que pot representar l'eliminació d'interferències si un cop preconcentrat l'analit es realitza un canvi del medi on està submergit l'elèctrode.

Els modificadors emprats habitualment amb l'objectiu de preconcentrar determinades espècies són:⁸⁰

Bescanviadors d'ions per preconcentrar cations (p.ex. el Nafió[®], bescanviador catiònic) o anions (p.ex. la polivinilpiridina, bescanviador aniònic),

Lligands específics per donar com a resultat de la reacció amb l'analit *compostos de coordinació* (p.ex. la dimetilgloxima) o *quelats* (p.ex. els criptans o èters corona),

Reactius orgànics per formar *sals insolubles* (p.ex. mercaptans) o per formar *enllaços covalents* (p.ex. la formació d'enllaços imina entre un aldehyd i una amina primària, com l'anilina) quan reaccionen amb l'analit.

Aquests modificadors han de formar enllaços selectius, forts i estables amb l'analit. Per tant, l'eficiència del procés de preconcentració ve determinada per l'afinitat i l'especificitat del modificador vers l'espècie a preconcentrar i, per tant, per la constant de formació del producte resultant de la reacció entre el modificador i l'espècie preconcentrada (analit). A més, la cinètica d'aquesta reacció ha d'ésser moderadament ràpida a fi de reduir el temps d'anàlisi i d'evitar la difusió del producte format cap a fora dels límits de la capa de preconcentració.

1.3.1.2 Permeabilitat selectiva

La permeabilitat selectiva a un sensor correspon a un pas de separació previ a la mesura que consisteix en l'alteració de les propietats físiques de la superfície d'un elèctrode com a conseqüència de la incorporació, a la configuració del sensor, d'una *barrera difusional permselectiva* a determinades espècies presents a la mostra. Aquesta barrera contribueix a l'augment de la selectivitat i a la millora de l'estabilitat dels sensors electroquímics. Això és degut a què aquests recobriments permselectius exclouen de la superfície espècies interferents i actuen com a barreres protectores, alhora que permeten el transport d'analit a través d'ells.

Les propietats en què es fonamenten les membranes permselectives, a fi d'afavorir o dificultar el pas de determinades espècies al seu través, són les *dimensions*, la *càrrega* o la *polaritat* de l'analit.⁷⁹

✓ **Dimensions:** Es pot dur a terme una exclusió selectiva passiva en base a les dimensions (p.ex. l'acetat de cel·lulosa pot tenir diferents grandàries de porus) que provocarà la disminució de la velocitat de difusió de determinades espècies presents a la solució.

✓ *Càrrega*: És possible obtenir un grau de permeabilitat diferenciat vers espècies iòniques amb càrregues oposades (p.ex. el Nafió® exclou interferències anióniques, alhora que permet preconcentrar els cations).

✓ *Polaritat*: En aquest cas el transport selectiu porta a l'exclusió o a la permeabilitat d'espècies segons la seva polaritat (p.ex. els recobriments lipídics permeten la detecció selectiva d'espècies hidrofòbiques per exclusió de les hidrofíliques).

Per tant, les barreres permselectives permeten assolir un alt grau d'especificitat en el transport, de vegades basat en la combinació de més d'una d'aquestes propietats, com per exemple les membranes que exclouen espècies segons les seves dimensions i la seva càrrega. A més, eviten la passivació de la superfície de l'elèctrode amb la seva actuació com a barreres protectores enfront de l'adsorció de molècules orgàniques d'alt pes molecular presents al medi o de l'acumulació de productes insolubles de la reacció.⁸¹

No obstant això, i atès que són barreres difusionals, el pas limitant de la velocitat de reacció ve fixat per la difusió de l'analit a través de la membrana permselectiva. Això fa que la concentració d'analit a la superfície de l'elèctrode sigui més petita que la concentració real a la solució fet que, en general, tot i augmentar el límit de detecció, permet controlar l'interval lineal de resposta a fi d'ampliar-lo. Per tant, les membranes permselectives fan viable l'ús de biosensors que incorporen enzims que posseeixen K_M desfavorables, ja que en realitat es treballa amb K_M aparents (K_M^{ap}), el valor de les quals esdevé fortament afectat per la presència de la membrana.²⁵

1.3.1.3 Electrocatàlisi

Si bé a § 1.1.1.2 ja es va parlar de la polarització dels elèctrodes per diferents motius i es va intentar resoldre aquest problema mitjançant estratègies que la minimitzen, resta esmentar un darrer factor que pot influir en el potencial de treball. Aquest darrer factor està relacionat amb l'*energia d'activació* necessària per dur a terme la reacció electroquímica, és a dir, amb la barrera energètica que cal superar perquè la reacció tingui lloc. Aquesta barrera resulta ésser molt més elevada quan la reacció succeeix sobre la superfície de l'elèctrode, ja que en aquest cas la cinètica de transferència electrònica és més lenta que quan es tracta d'una reacció en fase homogènia. Per tant, s'ha d'aplicar el potencial resultant de sumar al potencial termodinàmic un *sobrepotencial* d'activació, que depèn del material de què està fet l'elèctrode, de les propietats de la doble capa elèctrica que forma l'elèctrode amb la solució que té en contacte i de les característiques de l'espècie electroactiva.

En aquest cas, l'objectiu de la modificació química es fonamenta en minimitzar aquest sobrepotencial, atès que una disminució del potencial de treball comporta una reducció del número d'espècies que poden interferir al reaccionar electroquímicament i, per tant, suposa una millora de la selectivitat. Això s'aconsegueix afavorint la transferència electrònica entre l'analit i l'elèctrode mitjançant l'ús de *catalitzadors* o de *mediadors d'oxidació-reducció*.

Atès que tant els catalitzadors com els mediadors redox afavoreixen la transferència electrònica amb l'elèctrode, fet que s'observa com a un augment de la velocitat de reacció, s'anomena *electrocatalisi* al procés en el qual es veuen implicats. L'electrocatalisi és un procés catalític de transferència de càrrega que comporta un procés químic i un electroquímic.

Catalitzadors

La funció d'un catalitzador consisteix en facilitar la reacció, és a dir, disminuir l'energia d'activació necessària perquè la reacció tingui lloc. Com a conseqüència, sovint el que s'observa és un augment de la velocitat de reacció. És per això que els catalitzadors, ja siguin metàl·lics o d'origen biològic, s'han aprofitat per afavorir una transferència electrònica eficient entre la superfície de l'elèctrode i determinades espècies en solució.

Per la seva part, els catalitzadors metàl·lics s'incorporen en alguns casos com a micro o nanopartícules, atès que d'aquesta manera ofereixen una major superfície de contacte sobre la qual té lloc el procés de catalisi i, per tant, milloren la sensibilitat i la selectivitat del sensor. Els metalls habitualment usats com a catalitzadors són el platí, el pal·ladi, l'or i l'iridi.

Un altre tipus de catalitzadors, en aquest cas d'origen biològic, destinats a complir la mateixa funció, són els enzims. En aquest cas es pot parlar de *bioelectrocatalisi* (vegeu § 1.2).

Si bé alguns enzims, com la diaforasa (Dp) en el cas de l'oxidació del NADH,⁸² han d'acoblar la seva reacció a la d'algun mediador redox per poder accelerar la reacció electroquímica, a la bibliografia es recullen uns quants casos de sensors modificats únicament amb enzims.

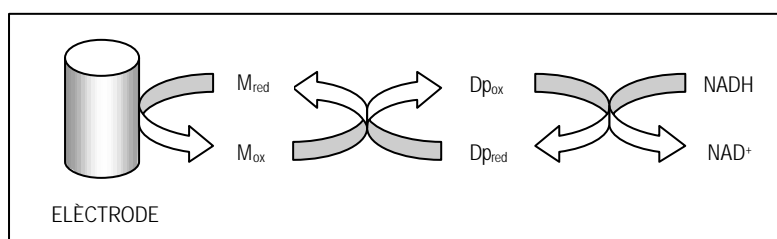


Figura 1.7: Esquema de l'oxidació de NADH mitjançant un procés d'electrocatalisi. L'enzim Dp, que facilita la transferència del H⁺ entre el parell NADH/NAD⁺, requereix la presència d'un mediador redox al sistema.

Un cas de bioelectrocatalisi directa sense modificadors, que mereix un esment especial, és el proposat per *Ghindilis et al.*,⁸³ basat en la coimmobilització dels enzims *glucosa oxidasa* (GOD) i *peroxidasa* (HRP) per a l'anàlisi potenciomètrica de glucosa. Mentre que la GOD catalitza l'oxidació de la glucosa, la HRP actua de bioelectrocatalitzador amb la finalitat de reduir el sobrepotencial de reducció del peròxid d'hidrogen sobre la superfície de l'elèctrode. La HRP permet la transferència electrònica directa

des de l'elèctrode cap al substrat (H_2O_2) a través del seu centre actiu, la qual cosa provoca un canvi del potencial d'elèctrode. La velocitat inicial d'aquests canvis de potencial és proporcional a la velocitat de formació de H_2O_2 i, per tant, també ho és a la concentració de glucosa. En resum, es pot dir que la HRP actua com a espècie "sensora" per a la mesura potenciomètrica de H_2O_2 .³⁷

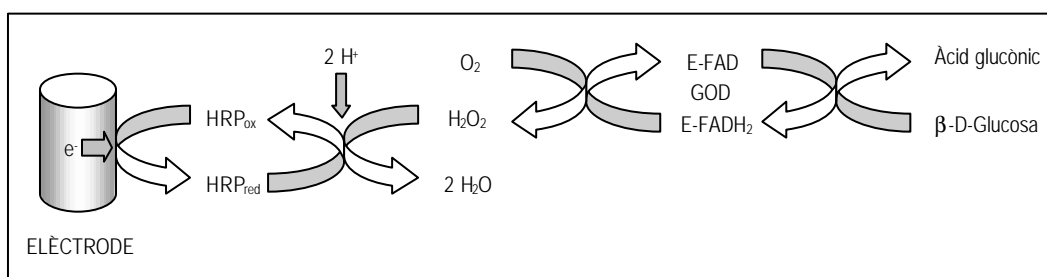


Figura 1.8: Esquema per a la detecció potenciomètrica de glucosa, a través d'un procés de bioelectrocatalisi. L'enzim HRP actua com a bioelectrocatalitzador.

Mediadors d'oxidació-reducció

Els mediadors d'oxidació-reducció són molècules sintètiques electroactives de baix pes molecular que també posseeixen propietats catalítiques, atès que es regeneren en un procés cíclic, i es caracteritzen per tenir una cinètica de transferència electrònica amb l'elèctrode (transferència heterogènia) quasi igual que amb les espècies en solució (transferència homogènia).

El fet de facilitar la transferència de càrrega entre l'elèctrode i l'analit, porta a que aquest procés es pugui dur a terme a un potencial molt més baix del que s'esperaria, la qual cosa redueix el número d'interferències possibles i millora, per tant, la selectivitat.

El mediador reacciona inicialment amb l'analit, a través d'una reacció redox homogènia, i després es difon cap a la superfície de l'elèctrode, on té lloc una transferència de càrrega ràpida. Amb aquesta segona reacció redox heterogènia es tanca el cicle catalític que dona lloc a la regeneració del mediador. Per tant, el potencial que correspon a la reacció de transferència electrònica heterogènia coincideix amb el potencial del mediador, essent més baix que el potencial redox de l'analit en fase heterogènia.²⁵

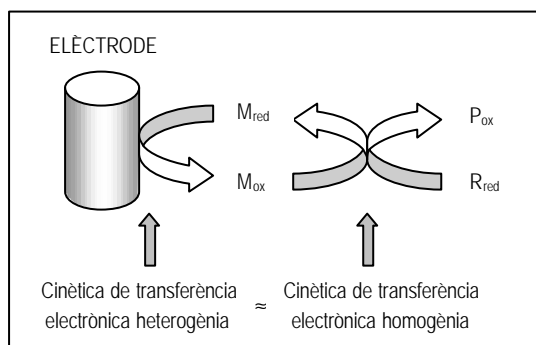


Figura 1.9: Esquema de l'oxidació d'un reactiu (R) a un producte (P) mitjançant un procés d'electrocatalísi que implica la presència d'un mediador redox al sistema.

Els mediadors redox han de complir les següents característiques:

- ✓ s'han de caracteritzar per posseir *cinètiques de transferència electrònica ràpides*, tant amb l'analit (homogènia) com amb l'elèctrode (heterogènia),
- ✓ han d'ésser *estables en les dues formes del parell redox*, és a dir, tant en forma oxidada com reduïda,
- ✓ han de presentar una *cinètica reversible*,
- ✓ han de tenir un *potencial redox més petit* o que es trobi inclòs a l'interval de potencial de treball òptim marcat per a la detecció amperomètrica sense mediadors,
- ✓ en funció de l'aplicació, *no poden ésser tòxics*⁸⁴
- ✓ especialment en aquells casos en què han de transferir electrons entre el seti actiu de l'enzim i la superfície electròdica, convé que posseïxin una *massa molecular baixa*.⁸⁵

Els mediadors redox es poden classificar en dos grans grups en funció de les seves propietats químiques: mediadors *organometàl·lics* i mediadors *orgànics*.⁸⁶

Els **mediadors organometàl·lics** incorporen un metall de transició a l'estructura orgànica de la molècula. El *ferrocè*⁸⁷ i els seus derivats destaquen per la seva versatilitat, basada en la possibilitat de tenir compostos amb diferents càrregues i solubilitats segons els substituents, i per les característiques favorables que els hi proporciona la introducció d'alguns grups. Per exemple, alguns grups aromàtics, com l'antracè, són útils per ancorar aquests compostos i millorar, per tant, la seva adsorció sobre la superfície de l'elèctrode. Altres mediadors organometàl·lics són les *ftalocianines* (Co), el *ferricianur*,⁸⁸ els *complexos d'òxid de ruteni* i les *metal·loporfirines* (Mn), entre d'altres.

D'altra banda, els **mediadors orgànics** són molècules orgàniques que posseïxen estructures amb dobles enllaços conjugats, que afavoreixen la deslocalització de càrrega, fet que facilita la transferència electrònica amb l'elèctrode. Els derivats de *fenoxazines*, *fenotiazines* i *fenazines*,^{89,90} juntament amb la *fenilendiamina* (PDA)⁹¹ i la *tetrametilfenilendiamina* (TMPD), s'han utilitzat àmpliament en la detecció del cofactor NADH de certes *deshidrogenases*. El parell redox *quinona-hidroquinona*,⁹² emprat

igualment en la detecció de NADH, es caracteritza per ésser útil tant en processos d'oxidació com de reducció. Una de les seves aplicacions habituals es fonamenta en la detecció de la reducció del H_2O_2 mitjançant l'ús de la HRP. Finalment, cal esmentar compostos com el *tetratiofulvalè* (TTF) i el *tetracianoquinodimetà* (TCNQ)⁸⁷ que, si bé per si sols actuen com a mediadors redox, també s'empren combinats per formar *sals orgàniques conductores* (p.ex. el TTF+TCNQ), útils per construir elèctrodes amb una elevada conductivitat elèctrica, atès que es tracta de dues molècules orgàniques planes amb sistemes externs d'electrons π que es solapen i, per tant, afavoreixen la deslocalització de càrrega.⁹³

El coneixement de les característiques de cada un dels mediadors és de gran utilitat a l'hora de decidir quin és el més adequat per a una determinada aplicació i en quina forma cal incorporar-lo al sistema.

1.3.2 ESTRATÈGIES D'INCORPORACIÓ DE MODIFICADORS A LA CONFIGURACIÓ D'UN SENSOR

Els estudis basats en l'ús de la tècnica de voltamperometria cíclica han permès observar comportaments diferenciats segons l'estratègia utilitzada a l'hora d'incorporar modificadors als procediments d'anàlisi electroquímica. Com a resultat, es consideren tres situacions model:

1. *Modificadors en solució.*
2. *Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar monocapes.*
3. *Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar pel·lícules polimèriques.*

1.3.2.1 Modificadors en solució

Una de les formes possibles d'emprar modificadors és afegir-los a la solució que conté l'analit. Habitualment, els modificadors usats en solució acostumen a ésser electrocatalitzadors, especialment mediadors redox.

Si bé aquesta no és una metodologia gaire elegant, permet obtenir resultats de forma ràpida, ja que no requereix cap pas previ d'immobilització. A més, cal afegir l'avantatge que representa la conservació de les seves propietats intactes, com a conseqüència de què no han d'experimentar cap reacció amb la finalitat d'ésser retinguts sobre la superfície de l'elèctrode. També és important destacar que el fet que no actuen com a reactiu limitant, atès que es troben a la solució en excés, permet obtenir sensibilitats més elevades. Per tant, si més no, és una bona opció per fer un estudi previ del comportament d'un modificador determinat.

Com a resultat de l'estudi voltamperomètric, s'obtenen per sistemes reversibles voltamperogrames cíclics similars al què es mostra a la Figura 1.2. A fi de poder comparar les diferències amb els voltamperogrames obtinguts per espècies immobilitzades en mono o multicapes, cal remarcar el fet que quan les espècies electroactives estan lliures en una solució no agitada, de manera que arriben a l'elèctrode per difusió, la intensitat de pic ve donada per l'*equació de Randles-Sevcik*

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C^b v^{1/2} \quad (1.20)$$

on n és el número d'electrons transferits, A és l'àrea de la superfície de l'elèctrode (cm^2), D és el coeficient de difusió de l'anàlit ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), C és la concentració d'espècie electroactiva a la solució ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$) i v és la velocitat d'escombrat de potencial ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$). D'aquesta equació se n'extreu que i_p és proporcional a $v^{1/2}$.

Tal com s'observa al voltamperograma de la Figura 1.2, un cop assolit el pic d'oxidació, la concentració d'espècie reduïda sobre la superfície de l'elèctrode és pràcticament nul·la i, per tant, s'ha de difondre espècie, susceptible d'ésser oxidada, de la solució cap a la superfície del sensor, amb la qual cosa, atès que es treballa amb tècniques d'escombrat ràpid, el pic decau lentament. El mateix s'observa quan s'assoleix el pic de reducció amb l'escombrat cap a potencials negatius, només que ara l'espècie consumida és l'oxidada prèviament.

1.3.2.2 Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar monocapes

Una segona estratègia possible, relacionada amb l'ús de modificadors, es basa en recobrir la superfície de l'elèctrode amb una *monocapa* de material electroactiu. En aquest cas, el voltamperograma cíclic resultant és bastant diferent a l'obtingut per a una espècie electroactiva en solució.

Si es considera de nou un sistema reversible, s'observa que un cop assolit el pic d'oxidació, comença a disminuir com en el cas esmentat prèviament, però ara ho fa tan ràpidament com ha pujat, ja que en aquest cas no hi ha difusió de material electroactiu cap a la superfície de l'elèctrode, atès que tot està immobilitzat sobre d'aquesta. Com a resultat, s'obté un pic totalment simètric.

La relació entre les intensitats de pic continua essent 1, però els seus valors venen definits per una altra expressió:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma v}{4RT} \quad (1.21)$$

on Γ correspon a la quantitat total de reactiu inicial present a la superfície de l'elèctrode. Per tant, es pot afirmar que el modificador ha estat immobilitzat quan es comprovi que la i_p depèn linealment de v , i no de $v^{1/2}$ com quan el modificador està en solució.

Una altra diferència, respecte al cas anterior, és que quan es té el modificador immobilitzat en una monocapa la separació teòrica entre els potencials catòdic i anòdic (ΔE) hauria d'ésser nul·la, tot i que a la pràctica resulta ésser inferior a 30 mV. A més, aquest valor no augmenta amb l'increment de v , fet que indica que no hi ha limitacions cinètiques.⁹⁴

Existeixen principalment dos mètodes per obtenir monocapes de modificador sobre la superfície de l'elèctrode: *adsorció* i *formació d'enllaços covalents*

L'**adsorció**, més concretament la *quimiosorció*, representa, com ja es va veure a § 1.2.2, la tècnica més senzilla i antiga per immobilitzar espècies sobre la superfície de l'elèctrode. Es fonamenta en la interacció resultant de compartir la densitat electrònica entre la molècula adsorbida i la superfície del transductor. Permet doncs assolir interaccions molt fortes i efectives entre molècules que tenen sistemes d'electrons π (substàncies olefíniques o compostos aromàtics) i la superfície de l'elèctrode, mitjançant el solapament resultant de compartir la densitat d'aquests electrons π amb el núvol electrònic del metall que forma l'elèctrode. L'assoliment de monocapes, o fins i tot submonocapes, requereix un contacte directe entre la molècula adsorbida i la superfície de l'elèctrode.

L'adsorció ha estat una tècnica d'immobilització molt emprada per retenir modificadors dirigits a preconcentrar espècies electroactives sobre la superfície de l'elèctrode o modificadors amb aplicacions electrocatalítiques.

Cal tenir en compte que existeixen certs inconvenients associats a aquest tipus d'immobilització. Per una banda, la monocapa formada és vulnerable a l'erosió. I per altra banda, l'adsorció rarament és completament irreversible, ja que es tracta d'un procés d'equilibri, fet que implica una desorció lenta del modificador cap a la solució que limita, com a conseqüència, el temps de vida del sensor.

La **formació d'enllaços covalents**, entre la superfície de l'elèctrode i certs grups funcionals del modificador, presenta un avantatge important respecte a l'adsorció, que es basa en què els enllaços formats són forts i irreversibles, de manera que no es produeix cap pèrdua de modificador al si de la solució.

Ara bé, aquesta tècnica requereix pretractaments delicats i, a vegades, també determinats processos d'activació (p.ex. un aport de temperatura,...), a fi de funcionalitzar la superfície de l'elèctrode. Així, malgrat els avantatges que suposa la formació d'enllaços covalents, el procés requereix un cert consum de temps i, en algunes ocasions, pot comportar una alteració inherent del modificador que dificultarà la seva funció.

Les vies emprades habitualment per formar enllaços covalents entre l'elèctrode i el modificador són:

- ✓ *l'ús de derivats de l'òxid de silici* que, o bé donen *reaccions de silanització*, o bé s'hidrolitzen per formar *polímers siloxans* i, aleshores, donen lloc a multicapes,
- ✓ *l'oxidació* de la superfície dels elèctrodes de carboni *amb àcids* per formar *grups carbonil* que reaccionen formant *enllaços èster* o *amida*,
- ✓ *l'ús de clorur de cianuril*.

Per tant, aquesta tècnica demana una preparació complicada que, en molts casos, no es veu justificada amb els resultats obtinguts.

Un altre mètode que es pot incloure com a una estratègia dirigida cap a l'obtenció de monocapes, i que es situa entre l'adsorció i la formació d'enllaços covalents, consisteix en la incorporació del modificador a la matriu polimèrica dels elèctrodes de carboni (vegeu § 1.2.2), ja siguin *elèctrodes de pasta de grafit*⁹⁵ o *compòsits rígids*^{96,97}. En el primer cas, si el modificador és una espècie fortament lipofílica, es

pot dissoldre en un *oli de parafina* que s'afegeix al grafit en pols, i així el modificador s'orienta de manera que deixa exposada la part hidrofílica, que sovint correspon als grups funcionals, cap a la solució on té lloc la reacció amb l'analit. En el segon cas, el modificador s'afegeix a la pasta, de manera que queda retingut a l'interior d'una matriu polimèrica rígida on es troba en contacte amb partícules de grafit. En aquest darrer cas, el poliment de la superfície permet l'obtenció de nou modificador. En ambdós casos, el modificador ha de complir una de les següents propietats: ha de ser insoluble o s'ha d'adsorbir fortament als components de la pasta, a fi d'evitar la seva dissolució cap a la mostra. A més, s'ha d'assegurar una molt bona homogeneïtzació, amb l'objectiu de què les anàlisis successives siguin reproduïbles.

1.3.2.3 Modificadors immobilitzats sobre la superfície de l'elèctrode per formar pel·lícules polimèriques

La metodologia d'immobilització més versàtil emprada per incorporar modificadors a l'anàlisi electroquímica, es basa en la formació de multicapes, les quals proporcionen una major robustesa i estabilitat a l'elèctrode en comparació a les monocapes.

El control acurat d'aquesta tècnica permet obtenir gruixos reproduïbles de fins a 10^5 capes,⁹⁸ fet que fa possible l'amplificació del senyal i, per tant, facilita la seva adquisició i tractament.

Els voltamperogrames cíclics obtinguts, quan la superfície de l'elèctrode està recoberta per un polímer, són molt variats i difícils d'interpretar, atès que depenen de diversos factors interrelacionats: la *transferència de càrrega*, el *transport de les espècies* a través del polímer i els *moviments de les cadenes polimèriques* per contrarestar càrregues o per acomodar les molècules de solvent que inflen el polímer. Ara bé, la velocitat del transport a través del polímer sembla obeir les *lleis de difusió*, fet que permet fer una aproximació del tipus de comportament del polímer mitjançant la mesura del *coeficient de difusió del transport de càrrega* (D_{tc}). Aquesta previsió es realitza a partir del valor de $(D_{tc} \tau / d^2)$, on τ correspon al temps de resposta que s'obté experimentalment i d és el gruix del polímer format sobre l'elèctrode.

Si $(D_{tc} \tau / d^2) \gg 1$ el voltamperograma s'aproxima al d'una monocapa, atès que això es pot donar quan la pel·lícula formada és prima, és a dir, quan el valor de d és petit.

En canvi, si $(D_{tc} \tau / d^2) \ll 1$, el voltamperograma s'assembla al d'una espècie en solució, fet que s'observarà per valors grans de d , és a dir, per pel·lícules polimèriques de gruix considerable. En aquests casos, l'espècie difondrà per l'interior del polímer cap a l'elèctrode com si ho fes en el si de la solució.

La comprovació experimental d'aquest model es porta a terme amb l'estudi de la variació de les intensitats de pic en funció de la velocitat d'escombrat (v). Així, en el primer cas, les dades experimentals segueixen el model corresponent a una monocapa adsorbida (Equació 1.21., on i_p és proporcional a v) mentre que, en el segon cas, els resultats s'ajusten al model descrit per a una

espècie electroactiva que és transportada cap a la superfície de l'elèctrode per difusió (Equació 1.20., on i_p és proporcional a $v^{1/2}$).⁹⁴

Les formes més utilitzades per preparar pel·lícules polimèriques són:

- ✓ L'*entrecruament* del modificador amb algun *agent bifuncional*, com el glutaraldehid,
- ✓ La *precipitació del polímer* sobre la superfície de l'elèctrode, bé mitjançant la immersió de l'elèctrode en una solució que conté el monòmer o el polímer ja format, o bé mitjançant la deposició d'una gota d'aquesta solució, que pot polimeritzar per si sola o bé pot requerir la immersió de l'elèctrode a una altra solució que provoqui la precipitació del polímer⁹⁹. En els dos primers casos s'ha de deixar evaporar el solvent en què es troben dissolts el monòmer o el polímer, mentre que la precipitació per immersió ja dona lloc al polímer directament. La deposició d'una gota, amb polimerització directa o mitjançant la precipitació per immersió, proporcionen resultats més acurats, gràcies a la possibilitat de controlar, de forma més reproducible, la quantitat de solució depositada.
- ✓ L'*electropolimerització del monòmer electroactiu*,¹⁰⁰ que consisteix en la formació del polímer *in situ* com a conseqüència de l'aplicació d'un tractament electroquímic adequat. Aquesta tècnica permet un control molt reproducible del gruix de la capa polimèrica.

Les capes polimèriques es poden classificar segons les seves propietats elèctriques en:

1. *Conductores*, emprades sovint en electrocatàlisi amb la finalitat de millorar les característiques de transferència electrònica.
2. *No conductores*, usades freqüentment com a barreres de difusió, o bé com a matrius d'espècies dirigides a preconcentrar l'analit i, a vegades, d'espècies electrocatalítiques. Per tant, s'incorporen als sensors per eliminar interferències, prevenir la passivació de la superfície de l'elèctrode, immobilitzar altres components (p.ex. enzims, cofactors), o atrapar mediadors (p.ex. poli(1,2-diaminobenzè)) a fi d'evitar la seva pèrdua per dissolució.¹⁰¹

Les *pel·lícules polimèriques conductores* es poden dividir alhora en:

Polímers d'intercanvi iònic o de coordinació que es tornen electroactius quan intercanvien alguns dels seus contraions no electroactius, compensadors de càrrega, per altres ions que sí són electroactius. Aleshores, la conductivitat s'origina quan té lloc un canvi d'estat d'oxidació, atès que aquest provoca un moviment d'ions destinat a equilibrar les càrregues que apareixen, trencant l'electroneutralitat. Alguns exemples de polímers d'aquest tipus són el Nafíó[®] o la polivinilpiridina en els quals se'ls ha intercanviat el contraí hipoclorit (ClO) per l'ió ferricianur (Fe(CN)₆³⁻).

Polímers redox que ja contenen espècies electroactives al seu interior.^{43,102} Aquests polímers condueixen l'electricitat via salts electrònics entre espècies amb diferent estat d'oxidació. Un exemple és la poli(o-quinona).

Polímers elèctricament conductors que, com els anteriors, també són electroactius per si mateixos.^{103,104} Presenten una deslocalització de càrrega, similar a la dels metalls, que els hi proporciona la conductivitat elèctrica. L'exemple més important és el polipirrol.

Les pel·lícules polimèriques gaudeixen d'una sèrie d'avantatges: són *fàcils de preparar*; el seu *gruix* pot ésser *reproducible*; són *insolubles* en la solució amb què estan en contacte, fet que evita les pèrdues de modificador; són molt *estables*, de manera que no es degraden fàcilment; i són *versàtils* en la seva formació, a fi de millorar certes característiques com la conductivitat del polímer.¹⁰⁵ Aquesta versatilitat de les multicapes prové de la possibilitat d'incorporar diferents components al polímer per donar *sistemes integrats*, mitjançant:¹⁰⁶

- ✓ la *formació d'enllaços covalents* entre determinades espècies i el polímer funcionalitzat,
- ✓ l'*atrapament* de les espècies desitjades (mediadors, enzims,...) a la matriu polimèrica durant el procés de formació o de deposició d'aquesta,
- ✓ la *copolimerització* de diversos monòmers amb diferents propietats.

1.4 AUTOMATITZACIÓ DEL PROCÉS ANALÍTIC

Una de les tendències principals de la química analítica es fonamenta en simplificar el procés analític. I una de les vies per poder assolir aquesta fita va dirigida a *automatitzar* les etapes que constitueixen el procés analític.

Com a resultat de la cerca d'una metodologia que permetés automatitzar els assaigs en sèrie va sorgir, a la dècada dels 70, el concepte d'un *sistema de flux segmentat per aire*, introduït per *Skeggs*, amb la finalitat de poder fer anàlisis químiques discretes en continu, sense que les mostres s'arribessin a barrejar entre elles. Aviat però, es comprovà que la introducció de segments d'aire no era necessària, ans al contrari, en realitat, complicava el sistema ja que provocava fluctuacions en el flux laminar establert i allargava el temps d'anàlisi atès que era necessari introduir, i després extreure, les bombolles d'aire.

Com a conseqüència, van aparèixer els *sistemes de flux continu*, com a una eina útil per realitzar assaigs ininterromputs de mostres discretes. Dins d'aquest grup cal destacar la *tècnica FIA (Flow Injection Analysis)*, definida per *Hansen* i *Ruzicka* l'any 1975.

Inicialment, la tècnica FIA es valorà per les millores tècniques que aportava, com ara la simplicitat dels components necessaris, la fàcil implementació als sistemes ja coneguts d'anàlisi i la possibilitat d'una velocitat de mostreig elevada amb l'obtenció de respostes quasi de forma immediata. Ara bé, la gran versatilitat que representa poder incloure diferents detectors i diferents components del sistema de flux, fet que ofereix la possibilitat de dur a terme de forma automatitzada una gran varietat d'etapes d'anàlisi, no només les més comunes (addició de reactius, dilució, mescla,...) sinó també altres de més complexes (diàlisi, destil·lació,...), juntament amb la capacitat de controlar reproduïblement la dispersió de la mostra, l'han convertit en una eina poderosa capaç de millorar la selectivitat i la sensibilitat de l'anàlisi instrumental.¹⁰⁷

La tècnica FIA consisteix en la injecció d'un volum de mostra conegut, amb la finalitat d'ésser inserit en una *solució portadora* no segmentada que flueix contínuament, amb un flux laminar, a través d'un tub que transporta la mostra fins al detector. Si bé el flux continu de reactius representaria un important desavantatge per l'elevat consum d'aquests, el fet d'injectar volums petits, d'uns pocs microlitres, minimitza aquest problema.

Un sistema FIA senzill consta dels següents components: ¹⁰⁸

Un **sistema de propulsió** (habitualment una bomba peristàltica) que impulsa les solucions cap al detector, a través dels tubs.

Una **vàlvula d'injecció** que permet introduir, de forma reproducible, un volum petit i controlat de mostra dins la solució portadora.

I un **detector**, responsable de la quantificació de l'anàlit.

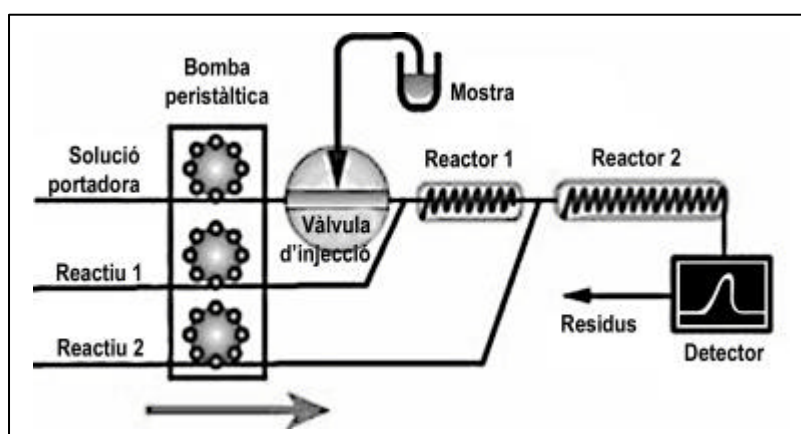


Figura 1.10: Esquema d'un sistema model d'injecció en flux (FIA).

Els líquids flueixen a través de tubs prims, de manera que la mostra es dispersa de forma reproducible dins la solució portadora, fet que permet la mescla i reacció amb els reactius. Com a resultat, quan la mostra arriba al detector el que s'obté és una resposta en forma de *pic FIA*, o *FIAGrama* (vegeu Figura 1.11), l'alçada i l'àrea del qual estan directament relacionades amb la concentració d'anàlit a la mostra. Aquesta relació s'extreu a partir de la comparació dels valors obtinguts per a aquestes variables quan s'injecta la mostra i quan s'injecten solucions amb una concentració d'anàlit coneguda (*corbes de calibració*).

El volum d'injecció, la velocitat de bomba i la llargada dels tubs, són variables que es poden modificar a fi d'obtenir la resposta més adient per a cada aplicació, atès que influeixen en el grau de dispersió i, per tant, en l'alçada i l'amplada del pic FIA. ¹⁰⁹

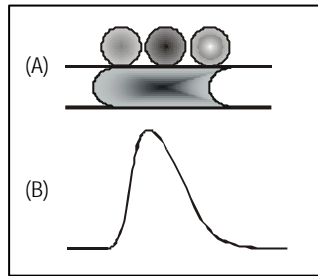


Figura 1.11: Dispersió del volum de mostra dins la solució portadora: (A) Esquema de les seccions transversal i longitudinal d'un tub del sistema FIA, on s'observa la dispersió del segment de mostra; (B) Senyal de resposta a la detecció del gradient de concentracions originat per la dispersió de la mostra.

Com ja s'ha esmentat prèviament, la versatilitat dels sistemes FIA permet incloure diferents components a fi d'efectuar de forma automatitzada diverses etapes del procés analític. Un exemple són els *reactors* en què té lloc la mescla i la reacció de la mostra amb els reactius per donar com a producte una espècie susceptible d'ésser mesurada pel detector.

En aquest sentit, la **integració de material biològic**, com ara els enzims, a un sistema de flux s'ha dut a terme de quatre formes diferents.

- ✓ La primera estratègia consisteix en introduir l'enzim **en solució**, com qualsevol altre reactiu. Malgrat que implica un cost elevat, atès el consum continu d'enzim, és la forma més senzilla i, possiblement, la més útil en aquells casos en què la reacció enzimàtica és irreversible.
- ✓ Una segona opció són els **biosensors enzimàtics**, que integren l'enzim immobilitzat a la configuració del sensor. Com ja es va comentar a § 1.2.2, la immobilització enzimàtica basada en la formació d'enllaços covalents proporciona les millors característiques de robustesa i estabilitat a aquests dispositius. A aquestes propietats cal afegir el fet que la quantitat d'enzim immobilitzat és mínima i, per tant, el cost és baix. A més, el temps de resposta és curt, ja que la reacció té lloc sobre el detector, fet que minimitza la dispersió i permet obtenir senyals molt reproduïbles.
- ✓ Una tercera estratègia són els **sistemes de bioreactors enzimàtics** que impliquen la incorporació d'un reactor que conté l'enzim immobilitzat. En aquest cas, s'immobilitza una quantitat considerable d'enzim, fet que representa una major estabilitat i un augment de l'activitat enzimàtica.¹¹⁰
- ✓ Finalment, una quarta i última opció es fonamenta en l'ús de partícules, com per exemple, partícules magnètiques modificades amb enzims¹¹¹, les quals són emprades per la *tècnica BIA* que es descriu més endavant.

Per últim, cal esmentar que existeixen diverses tècniques d'anàlisi en flux, cada una de les quals s'utilitza quan les condicions d'anàlisi així ho requereixen. Per exemple, la *tècnica del stopped flow* o la *tècnica d'anàlisi per injecció en flux seqüencial (SIA)*¹¹² en què la mostra i els reactius injectats queden

retinguts com a resultat de la inversió del sentit del flux, s'empren en casos en què es vol millorar la sensibilitat, ja que permeten augmentar el temps de residència, fet que comporta un augment de la conversió de l'analit en l'espècie mesurable. A més, demanen menys consum de reactius, de manera que també són útils en aquells casos en què els reactius emprats són cars. Altres avantatges d'aquestes tècniques són la robustesa i fàcil manipulació dels sistemes desenvolupats, que alhora ofereixen una gran versatilitat que permet el disseny de sistemes multiparamètrics. O bé, una altra tècnica és la *injecció en flux amb superfície renovable (FI-RST)*¹⁰⁷ que representa un gran ajut quan la reacció és irreversible, atès que redueix el temps d'anàlisi i, alhora, simplifica tot el procés analític. Finalment, la *tècnica BIA (Bead Injection Analysis)*¹¹³ representa una altra alternativa útil per a reaccions irreversibles, atès que es basa en la injecció i retenció a la cel·la d'unes partícules sòlides, sobre les que tindrà lloc la reacció, i la seva posterior elució per deixar el sistema preparat per a la següent anàlisi.

1.5 SITUACIÓ ACTUAL DELS BIOSENSORS

Durant l'any 2004 el mercat dels biosensors ha estat d'uns 5000 milions de dòlars, valor que es queda lleugerament enrera de les previsions fetes per als primers anys d'aquest segle XXI. De tota manera, el camp dels biosensors es troba en un creixement continu, accentuat en aquests darrers anys per les noves aplicacions en controls de qualitat i autenticitat, així com en seguretat, a més dels camps habituals de diagnòs clíniques i anàlisis medi-ambientals i d'aliments.¹¹⁴

Malgrat que cada vegada són més els laboratoris que han inclòs el camp dels biosensors electroquímics a les seves línies de recerca, encara existeixen certes limitacions que impedeixen la seva àmplia aplicació en situacions reals. Sovint els biosensors desenvolupats ofereixen una precisió, una sensibilitat, una selectivitat i una reproductibilitat inferiors a les pròpies de les tècniques convencionals. L'amplificació del senyal obtingut, sovint duta a terme mitjançant la incorporació d'enzims manipulats genèticament que alhora permeten obtenir biosensors amb una selectivitat millorada, és un dels objectius que s'han plantejat molt grups de recerca.¹¹⁵ Tanmateix, també s'han dedicat molts esforços a aconseguir biosensors més estables, basats en noves tècniques d'immobilització del material biològic o en l'ús de nous materials de característiques més properes a les dels medis que el material biològic emprat troba *in vivo*. No obstant això, actualment es poden resumir les tendències de treball del camp dels biosensors en dues vies ben definides: la *miniaturització* dels biosensors i el desenvolupament de noves modificacions químiques dels elèctrodes. En quant a la miniaturització, és una tendència sempre present, que freqüentment apareix com l'etapa final d'un sistema totalment desenvolupat, dirigida a millorar el comportament analític global i a reduir el consum de reactius i el temps d'anàlisi. Així, a la dècada dels anys 70 era necessari tot un laboratori per a poder realitzar qualsevol tipus d'anàlisi. La dècada dels anys 80 ja es va caracteritzar per l'ús d'instruments que incorporaven tots els components necessaris per a fer anàlisis. Aquests instruments

han anat tendint cap a grandàries menors, de manera que la dècada dels anys 90 es pot considerar com el període en què es van miniaturitzar els instruments cap a una escala *micro*. Actualment, la tendència passa per la *nanotecnologia*, amb conceptes molt interessants, com ho és el desenvolupament del que es coneix com a *lab-in-a-cell*, és a dir, sistemes que aprofiten la miniaturització a escala *nano* de tots els components necessaris, a fi de dur a terme anàlisis d'una sola cèl·lula.¹¹⁶ Aquesta miniaturització, que forçosament ha d'anar acompanyada del desenvolupament de noves tècniques de *microfabricació*, esdevé especialment interessant quan es volen fer determinacions *in vivo*. Així, per exemple, destaquen treballs com el realitzat per *Niwa et al.* que demostra que és possible fer mesures de l'alliberament de determinats neurotransmisors en volums de mostra de subnanolitres, mitjançant l'ús d'un detector electroquímic per electroforesi capil·lar amb una *matriu d'elèctrodes interdigitats* i un *microelèctrode* modificat amb enzim com a biosensor.¹¹⁷ D'altra banda, les modificacions químiques dels elèctrodes han estat, i continuen essent, un dels punts clau per a l'obtenció de nous biosensors electroquímics amb característiques analítiques òptimes. Hom considera que en aquestes modificacions recau la possibilitat de dissenyar a mida la superfície electròdica adequada a les necessitats del sistema de treball, que pot o no incloure material biològic. La cerca de nous mediadors d'oxidació-reducció i de noves vies per dur a terme llur incorporació als sistemes electroquímics es preveu que continuarà essent un dels aspectes centrals de la recerca bàsica relacionada amb el món dels biosensors.

1.6 OBJECTIUS

La incorporació de mediadors d'oxidació-reducció als sistemes biosensors amb detecció amperomètrica basats en enzims oxidoreductases va suposar un important avenç per enfrontar els problemes implícits en la detecció de les espècies implicades en les corresponents reaccions enzimàtiques, especialment peròxid d'hidrogen per als enzims oxidases i el cofactor NADH en el cas dels enzims deshidrogenases. Malgrat l'elevat nombre de treballs realitzats que combinen l'ús d'aquests enzims amb mediadors redox incorporats al sistema de detecció mitjançant diferents estratègies, encara avui sovint representa un problema la forma en què cal incorporar-los a la configuració electròdica, ja sigui perquè es dificulta l'obtenció de biosensors compactes, o bé perquè els biosensors resultants no són estables degut a la possibilitat de pèrdues continuades del mediador i, en definitiva, a disminucions de l'activitat catalítica pròpia d'aquesta espècie. És per tot això que representa una important aportació en el desenvolupament de biosensors amperomètrics basats en enzims oxidoreductases l'estudi de diferents modificacions químiques amb l'objectiu d'incorporar mediadors redox al sistema amperomètric de detecció, que han de ser compatibles amb el mètode d'immobilització del material biològic emprat.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat contribuir a la millora del desenvolupament de biosensors amperomètrics basats en enzims oxidoreductases que evitin els problemes de passivació de la

superfície del transductor, així com d'interferències degudes als elevats sobrepotencials que cal aplicar, mitjançant l'obtenció de cinètiques de transferència electrònica ràpides.

En aquest sentit les directrius que han dirigit el treball que aquí es presenta han estat:

I. Desenvolupament i avaluació de diferents sistemes sensors amperomètrics modificats químicament amb mediadors redox i altres catalitzadors, amb la finalitat d'obtenir una resposta sensible, selectiva i reproducible a l'oxidació del cofactor NADH i de peròxid d'hidrogen. L'estudi s'ha centrat en les modificacions químiques dels elèctrodes adreçades a resoldre o minimitzar els problemes relacionats amb l'ús d'elèctrodes sòlids com a transductors per a la determinació d'aquestes espècies. Entre els esmentats problemes s'inclouen una passivació gradual de la superfície electròdica, cinètiques de transferència electrònica lentes, sobrepotencials elevats i una baixa selectivitat.

II. Desenvolupament i optimització de biosensors amperomètrics modificats químicament basats en enzims oxidoreductases. En aquesta part del treball s'han adaptat les modificacions químiques, prèviament estudiades, a la immobilització d'enzims oxidoreductases, amb la finalitat de desenvolupar biosensors compactes de segona generació lliures dels problemes habitualment relacionats amb la determinació de les espècies implicades en les reaccions d'aquest tipus d'enzims. Amb aquest objectiu el treball s'ha dividit en:

IIA. Desenvolupament i optimització de biosensors amperomètrics modificats químicament basats en enzims deshidrogenases. Atès que el grup d'enzims deshidrogenases inclou nombrosos substrats i productes d'interès en camps diversos, com són el clínic, mediambiental i alimentari, s'ha treballat per aconseguir un sistema reproducible per al desenvolupament de biosensors basats en aquest tipus d'enzims. Com a un pas inicial, s'han desenvolupat biosensors per a lactat i per a ió amoni, basats en els enzims *lactat deshidrogenasa* i *glutamat deshidrogenasa* respectivament. Posteriorment, s'ha emprat el biosensor per a ió amoni com a base d'un biosensor per a urea que alhora incorpora l'enzim *ureasa*. Cal destacar en aquesta part l'ampli ventall de possibilitats que sembla oferir l'aplicació de la polisulfona en el desenvolupament de biosensors, un material que fins ara mai s'havia usat en el camp dels sensors químics.

IIB. Desenvolupament i optimització de biosensors amperomètrics modificats químicament basats en enzims oxidases. S'ha incorporat l'enzim *glucosa oxidasa* a les matrius de xerogel, amb caràcter catalític, desenvolupades anteriorment com a modificació química dels transductors emprats per a la determinació de peròxid d'hidrogen.

III. Aplicació de la *tecnologia serigràfica* per a la construcció dels biosensors prèviament desenvolupats, com a elèctrodes de configuració plana, i la seva consegüent implementació a un sistema de flux continu. L'objectiu ha estat demostrar que les característiques dels biosensors desenvolupats (selectivitat, sensibilitat, reproductibilitat i temps de resposta) permet la seva implementació a un sistema FIA, capaç de proporcionar mesures més acurades i en menys temps que un sistema discret, a més de representar el camí cap a l'automatització dels sistemes de determinació.

L'obtenció de sensors estables modificats químicament que resolen els problemes de la detecció amperomètrica d'espècies implicades a les reaccions enzimàtiques d'enzims oxidoreductases obre camí al desenvolupament de nombrosos biosensors, atès l'elevat nombre d'enzims oxidoreductases que es coneixen i la versatilitat que aporta la varietat de substrats i productes que es veuen implicats a les reaccions que catalitzen.

1.7 BIBLIOGRAFIA

- ¹ L. C. Clark, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor. *Journal of Applied Physiology*, **6** (1953) 189-193
- ² T. Grandke, W. H. Ko. *Sensors: A Comprehensive Survey. Vol.1. Fundamentals and General Aspects*. Weinheim, VCH (1989) p 2
- ³ A. J. Cunningham. *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York, John Wiley & Sons, Interscience (1998) pp 15-17
- ⁴ A. Bratov, J. Peral, S. Alegret. *Química Analítica*, **14** (1995) 3-16
- ⁵ C. R. Tamana, S. P. Mulvaney, K. A. Wahowski, M. C. Tondra, L. J. Whitman, R. J. Colton. Sessió oral. *The Eight World Congress on Biosensors*. Granada, maig de 2004.
- ⁶ A. Tzoris, E. A. H. Hall. *Analytica Chimica Acta*, **460** (2002) 257-270
- ⁷ S. Alegret. *Arxius de les Seccions de Ciències*, I.E.C. **100** (1995) 385-397
- ⁸ E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret. *Journal of Chemical Education*, **71** (1994) A67-A70
- ⁹ S. Alegret, A. Florido. *Analyst*, **116** (1991) 473-476
- ¹⁰ A. Sharma, K. R. Rogers. *Measurement Science & Technology*, **5** (1994) 461-472
- ¹¹ J. Wang. *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. New York, VCH (1988) pp 20-22
- ¹² A. Merkoçi, S. Alegret. *Trends in Analytical Chemistry*, **21** (2002) 717-725
- ¹³ S. Piletsky, A. P. F. Turner. *Molecular Imprinting*. Georgetown, USA, Landes Bioscience (2004)
<http://www.landesbioscience.com/iu/output.php>
- ¹⁴ X.-E. Zhang. Sessió oral. *The Eight World Congress on Biosensors*. Granada, maig de 2004.
- ¹⁵ M. P. Byfield, R. A. Abuknesha. *Biosensors & Bioelectronics*, **9** (1994) 373-400
- ¹⁶ D. Leech. *Chemical Society Reviews*, (1994) 205-213
- ¹⁷ M. Santandreu, S. Solé, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas. "Immunosensor systems with renewable sensing surfaces". A B. Hock et al. (Ed.). *Biosensors for Environmental Applications*. Leipzig, Germany, B. G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart (1998) pp 64-89
- ¹⁸ L. I. Blum, P. R. Coulet. *Biosensors Principles and Applications*. New York, Marcel Dekker (1991) pp 249-266
- ¹⁹ C. Blake, B. J. Gould. *Analyst*, **109** (1984) 533-547
- ²⁰ A. Merkoçi, M. Aldavert, S. Marín, S. Alegret. *Trends in Analytical Chemistry*, (2004) (en premsa)
- ²¹ M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 291-303
- ²² P. Vadgama, P. W. Crump. *Analyst*, **117** (1992) 1657-1670
- ²³ K. Lettau, E. Yilmaz, F. W. Scheller, A. Warsinke. *The Eight World Congress on Biosensors*. Granada, maig de 2004.
- ²⁴ K. Haupt. *Analytical Chemistry*, **75** (2003) 376A-383A

- ²⁵ L. Gorton, E. Csöregi, E. Domínguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson. *Analytica Chimica Acta*, **250** (1991) 203-248
- ²⁶ L. C. Clark, C. Lyons. *Ann. NY Academy of Sciences*, **102** (1962) 29-45
- ²⁷ I. Willner, E. Katz. *Angewandte Chemie, International Edition*, **39** (2000) 1180-1218
- ²⁸ L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan. *Analytica Chimica Acta*, **400** (1999) 91-108
- ²⁹ A. Heller, Y. Degani. *Journal of Chemical Society*, **110** (1988) 2615-2620
- ³⁰ I. Willner, E. Katz, B. Willner. *Electroanalysis*, **9** (1997) 965-977
- ³¹ K. Sode. Sessió oral. *The Eight World Congress on Biosensors*. Granada, maig de 2004.
- ³² H. Yamaoka, T. Tsuya, C. Sakata, N. Kakehi, K. Sode. Sessió oral. *The Eight World Congress on Biosensors*. Granada, maig de 2004.
- ³³ A. E. G. Cass, E. Kenny. "Protein engineering and its potential application to biosensors". A. A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson (Ed.). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford Science Publications (1997) pp 113-132
- ³⁴ G. M. Whitesides. *Science*, **254** (1991) 1312-1319
- ³⁵ H. O. Finklea. A. A. J. Bard (Ed.). *Electroanalytical Chemistry, Vol. 19*. New York, Marcel Dekker (1996) pp 114-335
- ³⁶ A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox. *Principios de Bioquímica* Barcelona, Ediciones Omega, S.A. (1993) pp 211-222
- ³⁷ L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ³⁸ A. M. Donlan, G.J. Moody, J.D.R. Thomas. *Analytical Letters*, **22** (1989) 1873-1896
- ³⁹ J. C. Gayet, A. Haouz, A. Geloso-Meyer, C. Burstein. *Biosensors & Bioelectronics*, **8** (1993) 177-183
- ⁴⁰ S. Fennouh, V. Casimiri, A. Geloso-Meyer, C. Burstein. *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (1998) 903-909
- ⁴¹ A. Amine, C. Cremisini, G. Palleschi. *Mikrochimica Acta*, **121** (1995) 183-190
- ⁴² V. Volotovskiy, Y. J. Nam, N. Kim. *Sensors and Actuators*, **B42** (1997) 233-237
- ⁴³ G. Jeanty, J.-L. Marty. *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (1998) 213-218
- ⁴⁴ J.-L. Marty, R. Rouillon, K. Sode, I. Karube. *Biosensors'90 Proceeding*. Amsterdam, Elsevier (1990) pp 85-86
- ⁴⁵ M. Stoytcheva. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, **103** (1994) 147-149
- ⁴⁶ M. Stoytcheva, V. Sharkova, J. P. Magnin. *Electroanalysis*, **10** (1998) 994-998
- ⁴⁷ M. Stoycheva, V. Sharkova, M. Panayotova. *Analytica Chimica Acta*, **364** (1998) 195-201
- ⁴⁸ C. Tran-Minh. *Les biocapteurs. Principes, construction et applications*. Paris, Masson (1991) pp 34-40
- ⁴⁹ C. Tran-Minh. *Ion-Selective Electrode Reviews*, **7** (1985) 41-75
- ⁵⁰ W. G. Kuhr, V. L. Barrett, M. R. Gagnon, P. Hopper, P. Pantano. *Analytical Chemistry*, **65** (1993) 617-622

- ⁵¹ M. Mascini, S. Selleri. *Analytical Letters*, **22** (1989) 1429-1449
- ⁵² G. Palleschi, A. Turner. *Analytica Chimica Acta*, **234** (1990) 459-463
- ⁵³ G. Jonsson, L. Gorton. *Electroanalysis*, **1** (1989) 465-468
- ⁵⁴ A. Heller. *Journal of Physical Chemistry*, **96** (1992) 3579-3587
- ⁵⁵ S. Cosnier. *Electroanalysis*, **9** (1997) 894-902
- ⁵⁶ J. Hu, A. Turner. *Analytical Letters*, **24** (1991) 15-24
- ⁵⁷ M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret. *Analytica Chimica Acta*, **442** (2001) 35-44
- ⁵⁸ R. M. Ianniello, T. J. Lindsay, A. M. Yacynych. *Analytical Chemistry*, **54** (1982) 1098-1101
- ⁵⁹ J. M. Laval, C. Bourdillon. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **152** (1983) 125-141
- ⁶⁰ Q. Chen, Y. Kobayashi, H. Takeshita, T. Hoshi, J. Anzai. *Electroanalysis*, **10** (1998) 94-97
- ⁶¹ H.-L. Schmidt, W. Schuhmann. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 127-135
- ⁶² M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret. *Sensors and Actuators*, **B69** (2000) 153-163
- ⁶³ P. N. Bartlett, J. M. Cooper. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **362** (1993) 1-12
- ⁶⁴ S. Alegret, A. Merkoçi. "Composite and biocomposite materials for electrochemical sensing". A. S. Alegret (Ed.). *Integrated analytical systems*. Amsterdam, Elsevier (2003) pp 377-412
- ⁶⁵ S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, M. del Valle. *Sensors and Materials*, **8** (1996) 147-153
- ⁶⁶ F. Céspedes, S. Alegret. *New Materials for Electrochemical Sensing, Food Technol. Biotechnol.*, **34** (1996) 143-146
- ⁶⁷ S. Alegret. *Analyst*, **121** (1996) 1751-1758
- ⁶⁸ G. Puu, I. Gustafson, P.-A. Ohlsson, G. Olofsson, A. Sellström. A. J. C. Gomes-Fernández, D. Chapman, L. Racker (Ed.). *Progress in Membrane Technology*. Basel, Birkhäuser (1991) pp 279-290
- ⁶⁹ M. Kühner, R. Tampe, E. Sackmann. *Biophysical Journal*, **67** (1994) 217-226
- ⁷⁰ Q. Xin, R. M. Wightman. *Analytica Chimica Acta*, **341** (1997) 43-51
- ⁷¹ M. J. Tarlov, E. F. Bowden. *Journal of the American Chemical Society*, **113** (1991) 1847-1849
- ⁷² C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J.-M. Savéant. *Journal of the American Chemical Society*, **116** (1994) 10328-10329
- ⁷³ J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 811-817
- ⁷⁴ R. Köneke, C. Menzel, R. Ulber, K. Schügerl, T. Scheper, M. Saleemuddin. *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 1229-1236
- ⁷⁵ E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, A. J. J. Olsthoorn. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **368** (1994) 165-171
- ⁷⁶ B. Gründig. *Strategies for Stable Immobilization of Enzymes in Biosensors*. Biosensor Stability. 4th Workshop. Ceret, Octubre (1999)

- ⁷⁷ A. J. Cunningham. *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York, John Wiley & Sons, Interscience (1998) pp 98-102
- ⁷⁸ J. Kulys, G. Gleixner, W. Schuhmann, H-L. Schmidt. *Electroanalysis*, **5** (1993) 201-207
- ⁷⁹ J. Wang. *Electroanalysis*, **3** (1991) 255-259
- ⁸⁰ K. Kalcher. *Electroanalysis*, **2** (1990) 419-433
- ⁸¹ C. A. Groom, J. H. T. Luong. *Analytical Letters*, **26** (1993) 1383-1390
- ⁸² H. C. Chang, A. Ueno, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida. *Analyst*, **116** (1991) 793-796
- ⁸³ A. L. Ghindilis, I. N. Kurochkin. *Biosensors & Bioelectronics*, **9** (1994) 353-357
- ⁸⁴ A. A. Sharkawy, B. Klitzman, G. A. Truskey, W. M. Reichert. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40** (1998) 598-605
- ⁸⁵ A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson. *Biosensors. Fundamentals and Applications*. New York, Oxford University Press (1989) pp 259-264
- ⁸⁶ S. A. Wring, J. P. Hart. *Analyst*, **117** (1992) 1215-1229
- ⁸⁷ P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. Pandey. *Analytical Letters*, **31** (1998) 2327-2348
- ⁸⁸ B. G. Milagres, G. de O. Neto, L. T. Kubota, H. Yamanaka. *Analytica Chimica Acta*, **347** (1997) 35-41
- ⁸⁹ A. K. Abass, J. P. Hart, D. C. Cowell, A. Chappell. *Analytica Chimica Acta*, **373** (1998) 1-8
- ⁹⁰ L. Mao, K. Yamamoto. *Talanta*, **51** (2000) 187-195
- ⁹¹ S. L. Álvarez-Crespo, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. *Biosensors & Bioelectronics*, **12** (1997) 739-747
- ⁹² P. Domínguez Sánchez, P. Tuñón Blanco, J. M. Fernández Álvarez, M. R. Smith, R. O'Kennedy. *Electroanalysis*, **2** (1990) 303-308
- ⁹³ J. E. Frew, H. A. O. Hill. *Analytical Chemistry*, **59** (1987) 933A-944A
- ⁹⁴ H. D. Abruña. *Coordination Chemistry Reviews*, **86** (1988) 135-189
- ⁹⁵ R. N. Adams. *Analytical Chemistry*, **30** (1958) 1576
- ⁹⁶ A. Morales, F. Céspedes, S. Alegret. *Materials Science and Engineering*, **C7** (2000) 99-104
- ⁹⁷ D. Martorell, F. Céspedes, E. Martínez-Fábregas, S. Alegret. *Analytica Chimica Acta*, **337** (1997) 305-313
- ⁹⁸ E. Barendrecht. *Journal of Applied Electrochemistry*, **20** (1990) 175-185
- ⁹⁹ C. A. Smolders, A. J. Reuvers, R. M. Boom, I. M. Wienk. *Journal of Membrane Science*, **73** (1992) 259-275
- ¹⁰⁰ P. N. Bartlett, J. M. Cooper. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **362** (1993) 1-12
- ¹⁰¹ S. A. Emr, A. M. Yacynych. *Electroanalysis*, **7** (1995) 913-923
- ¹⁰² P. D. Hale, L. I. Bouguslavsky, T. Inagaki, H. I. Karan, H. S. Lee, T. A. Skotheim. *Analytical Chemistry*, **63** (1991) 677-682

- ¹⁰³ S. B. Adeloju, G. G. Wallace. *Analyst*, **121** (1996) 699-703
- ¹⁰⁴ S. A. Emr, A. M. Yacynych. *Electroanalysis*, **7** (1995) 913-923
- ¹⁰⁵ P. T. Kissinger, W. R. Heineman. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. New York, Marcel Dekker (1996) pp 408-411
- ¹⁰⁶ W. Schuhmann. *Mikrochimica Acta*, **121** (1995) 1-29
- ¹⁰⁷ J. Ruzicka. *Analytica Chimica Acta*, **308** (1995) 14-19
- ¹⁰⁸ J. Ruzicka, E. H. Hansen. *Flow Injection Analysis*. New York, John Wiley & Sons (1981) pp 99-122
- ¹⁰⁹ J. Ruzicka, E. H. Hansen. *Analytica Chimica Acta*, **114** (1980) 19-44
- ¹¹⁰ S. Lam, G. Malikin. *Analytical Applications of Immobilized Enzyme Reactors*. Glasgow, Blackie Academic & Professional (1994) pp 1-18
- ¹¹¹ S. Solé, A. Merkoçi, S. Alegret. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **33** (2003) 127-143
- ¹¹² J. Ruzicka, C. D. Marshall. *Analytica Chimica Acta*, **237** (1990) 329-343
- ¹¹³ J. Ruzicka, C. H. Pollema, K. M. Scudder. *Analytical Chemistry*, **65** (1993) 3566-3570
- ¹¹⁴ A. P. F. Turner, N. Magan. Presentació oral al congrés *Euroanalysis 13*, inclosa com a sessió del Food Safety Symposium, Salamanca 7 de setembre 2004.
- ¹¹⁵ C. Loechel, A. Basran, J. Basran, N. J. Scrutton, E. A. H. Hall. *Analyst*, **128** (2003) 889-898
- ¹¹⁶ <http://mesainfo.el.utwente.nl/mutas/bios/index.php>
- ¹¹⁷ O. Niwa, R. Kurita, Z. Liu, T. Horiuchi, K. Torimitsu. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 949-955

**PART I. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE SENSORS
AMPEROMÈTRICS MODIFICATS QUÍMICAMENT**

PART I. DESENVOLUPAMENT I AVALUACIÓ DE SENSORS AMPEROMÈTRICS MODIFICATS QUÍMICAMENT

El desenvolupament dels sensors amb detecció amperomètrica freqüentment s'ha vist dificultat per problemes implícits en l'ús d'elèctrodes sòlids com a base del procés de transducció. Sovint, el principal inconvenient ha estat la passivació gradual de la superfície electròdica, no només per molècules orgàniques com ara surfactants, sinó també per compostos que apareixen a la pròpia reacció que s'està duent a terme sobre l'elèctrode. Un segon problema, que en molts casos ha impedit el desenvolupament de biosensors per a certs analits d'interès, són les cinètiques de transferència electrònica sobre els materials habitualment emprats en la construcció d'elèctrodes, que esdevenen prohibitivament lentes. Per últim, com a conseqüència del que s'acaba de dir, es fa necessària l'aplicació de potencials de treball elevats que han de permetre transferències electròniques suficientment ràpides, però que alhora impliquen una pèrdua de l'habilitat per discriminar entre soluts que posseeixen comportaments electroquímics similars.

Amb l'objectiu d'eliminar les limitacions descrites, les modificacions físiques i químiques dels elèctrodes han representat un nou pas, sovint necessari, en el desenvolupament dels sensors electroquímics. Mitjançant el control i la possible manipulació de la superfície electròdica s'ha aconseguit el desenvolupament de biosensors amperomètrics per a la determinació de nombrosos analits en matrius que abans representaven un inconvenient insalvable, alhora que s'ha millorat notablement la sensibilitat, la selectivitat i, en general, el comportament de tots aquests sistemes.

Atesa la importància dels enzims *oxidoreductases* en el desenvolupament de biosensors enzimàtics amb detecció electroquímica, en els propers cinc capítols s'ha dirigit el treball cap a l'obtenció de quimiosensors modificats químicament amb l'objectiu de resoldre els problemes associats amb una detecció amperomètrica per a biosensors basats en enzims *deshidrogenases*, que necessiten el cofactor NADH, i *oxidases*, dependents d'oxigen.

El treball s'ha centrat primerament en l'estudi dels problemes implícits en la determinació amperomètrica del cofactor NADH. La passivació gradual de la superfície electròdica, acompanyada de cinètiques de transferència electrònica lentes i els sobrepotencials necessaris, responsables d'una disminució important de la selectivitat, han portat a estudiar diferents modificacions físiques i químiques dels elèctrodes, com a possibles solucions als inconvenients que acompanyen als sistemes basats en enzims *deshidrogenases*. L'aplicació de diferents pretractaments electroquímics permet obtenir superfícies inicials reproduïbles del transductor, per bé que no ajuda a resoldre els problemes de passivació. Com a conseqüència, s'han emprat diferents tractaments, adreçats a regenerar la superfície electròdica, o bé a prevenir la passivació. Després d'avaluar els resultats de diverses tècniques de regeneració de la superfície ja passivada, l'estudi s'ha centrat en diferents tractaments adreçats a prevenir l'adsorció de les espècies que provoquen la pèrdua continuada de sensibilitat, centrant-se finalment en modificacions químiques basades en la incorporació de mediadors d'oxidació-reducció a la configuració electròdica. Així, s'ha estudiat un grup representatiu de mediadors amb diferents característiques, mitjançant l'avaluació de diverses estratègies d'incorporació d'aquestes espècies a la

configuració del quimiosensor. Cal destacar l'estudi exhaustiu dut a terme amb la polisulfona, un nou material polimèric emprat per a la preparació de membranes que serveixen com a matriu per a la incorporació de mediadors d'oxidació-reducció a la configuració del sensor.

Finalment, s'han desenvolupat nous materials basats en composts formats per xerogels amb metalls dispersos, com a modificacions químiques adreçades a afavorir la transferència electrònica heterogènia entre el peròxid d'hidrogen i el transductor. Aquesta part de la recerca ha tingut com a objectiu principal l'obtenció de quimiosensors útils per al posterior desenvolupament de biosensors basats en enzims flavoproteïnes oxidases, car s'ha optat per treballar amb detecció basada en la determinació del peròxid d'hidrogen format, com a alternativa a la que es fonamenta en el seguiment de la concentració d'oxigen, la qual presenta una sèrie de inconvenients que compliquen la seva aplicació. Els quimiosensors desenvolupats han permès detectar el peròxid d'hidrogen, tant mitjançant la seva oxidació, essent prou sensibles com per poder treballar a potencials suficientment baixos que evitin els problemes relacionats de baixa selectivitat, com la seva reducció, treballant a potencials prou elevats perquè l'oxigen no es pugui reduir provocant interferències.

2 ESTUDI DEL COMPORTAMENT DE TRANSDUCTORS EMPRATS EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH

2.1 INTRODUCCIÓ

Els enzims del tipus *oxidoreductases* catalitzen l'oxidació d'un gran nombre de compostos mitjançant l'ús d'oxigen o del cofactor NAD⁺. La gran versatilitat d'aquesta classe d'enzims obre un camí important cap al desenvolupament de biosensors amperomètrics per a la determinació de nombrosos analits d'interès clínic, ambiental o industrial. Tradicionalment els enzims oxidoreductases s'han dividit en dos grans grups: els *enzims deshidrogenases* dependents del cofactor *nicotin adenin dinucleòtid* (NAD(P)⁺/NAD(P)H)¹ i els *enzims oxidases* basats en flavoproteïnes. Ambdós grups d'enzims presenten certs avantatges i inconvenients per a ser incorporats en biosensors. Els avantatges sovint venen dictats per la facilitat que ofereixen els enzims per a ésser acoblats a l'analit que es vol determinar i alhora al tipus de transducció emprada. Mentre que els inconvenients es centren en la dependència dels enzims oxidases de l'oxigen, que afecta a la sensibilitat i selectivitat del biosensor desenvolupat, i per als enzims deshidrogenases, en els elevats sobrepotencials necessaris per a l'oxidació del cofactor NADH, i en els problemes de passivació de la superfície electròdica i de disminució de la selectivitat que d'aquests se'n deriven. Atès que els problemes relacionats amb els enzims oxidases esdevenen reduïts notablement quan es treballa amb sistemes ben oxigenats, inicialment ens centrarem en l'estudi dels problemes associats a l'ús d'enzims deshidrogenases amb l'objectiu de cercar possibles solucions a la detecció amperomètrica del cofactor NADH.

El NAD⁺, a diferència del grup prostètic FAD enllaçat fortament a les flavoproteïnes, actua com un cosubstrat indispensable, que s'ha d'enllaçar a l'*apoenzim* a fi de transformar-lo en *holoenzim*. Així, l'enzim esdevé actiu com a conseqüència de la nova conformació adoptada, de manera que ja pot reaccionar amb el substrat per catalitzar la formació del producte de la reacció enzimàtica.

Ateses les propietats òptiques i electroquímiques del parell NADH/NAD⁺, sovint s'empra el seguiment de la transformació d'una de les espècies constituents del parell en l'altra com a fonament del sistema de detecció de les anàlisis basades en reaccions enzimàtiques que incorporen algun enzim deshidrogenasa. Tradicionalment, la majoria dels assaigs s'han dut a terme mitjançant mesures espectrofotomètriques, aprofitant les absorcions que presenten les espècies del parell NADH/NAD⁺ en els espectres d'ultraviolat-visible. Ara bé, les característiques electroquímiques de la molècula de NADH també fan possible el seu seguiment mitjançant tècniques electroquímiques.

Si bé els assaigs electroquímics presenten una sèrie d'avantatges en relació als espectrofotomètrics,² entre els que cal destacar la reducció del temps d'anàlisi, una mínima manipulació de la mostra, l'ús d'un equip més econòmic i la possibilitat de fer mesures en sistemes en condicions més flexibles (mostres tènboles o acolorides,...), sorprèn observar el reduït número de publicacions que proposen una

detecció electroquímica per sistemes que incorporen enzims deshidrogenases. Aquest ús restringit és degut principalment a la irreversibilitat de la reacció electroquímica del parell NADH/NAD⁺ sobre un elèctrode sense modificar. Aquesta limitació esdevé agreujada pel valor de potencial relativament baix associat al procés de reducció del NAD⁺ a NADH, que reflexa un feble poder oxidant del NAD⁺.³ Per això, habitualment, s'intenta basar el sistema de detecció en l'oxidació de NADH, si bé el sobrepotencial⁴ necessari provoca una pèrdua de selectivitat. En aquest punt, sorgeix un altre factor que dificulta la viabilitat de treballar amb el parell NADH/NAD⁺ com a sistema de detecció redox, atès que el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺ sovint porta associades una sèrie de complexes reaccions paral·leles, que es caracteritzen per produir una *passivació* progressiva de la superfície de l'elèctrode.^{5,6}

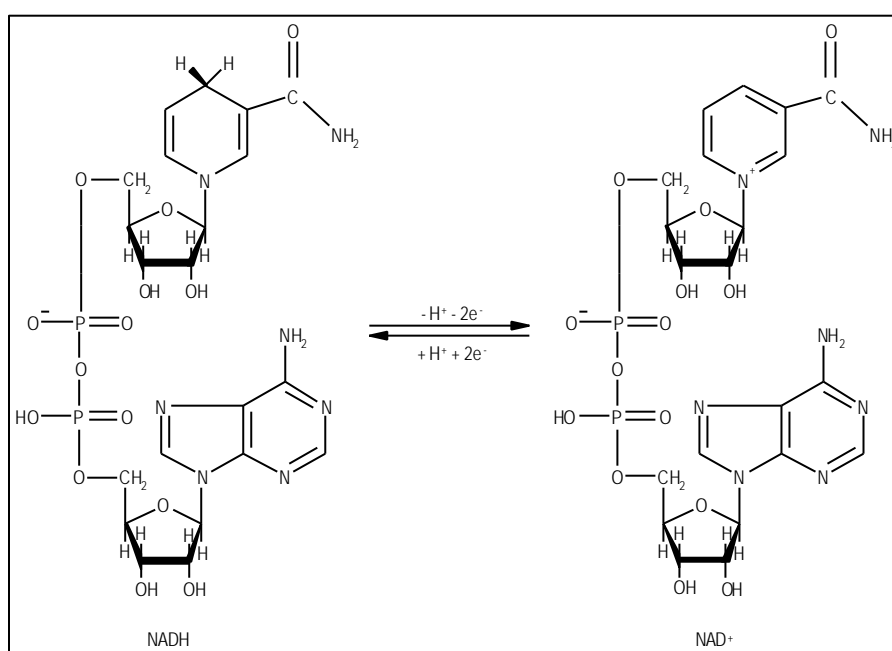


Figura 2.1: Reacció d'oxidació-reducció del parell NADH/NAD⁺.

Malgrat la dificultat palesa en relació a l'ús de sistemes electroquímics per a la detecció de NADH, l'elevat nombre d'enzims deshidrogenases descrits, associats a reaccions enzimàtiques que impliquen un ampli ventall de substrats i productes, permet dissenyar sistemes d'anàlisi molt versàtils que justifiquen els esforços dirigits a resoldre aquest tipus de problemes.

Així, en el present treball l'interès per l'estudi del comportament del sistema redox NADH/NAD⁺ va sorgir de la necessitat d'incorporar un enzim del tipus *deshidrogenasa* al sistema de detecció d'un

sistema de flux desenvolupat per a la determinació de metalls pesants en aigües de riu basat en la inhibició de l'enzim *ureasa*.

Si bé inicialment el sistema dissenyat, mostrat a la Figura 2.2, es va basar en la detecció potenciomètrica de l'ió amoni obtingut com a producte de la reacció enzimàtica de l'enzim ureasa amb la urea, mitjançant un *elèctrode selectiu d'ió amoni*,⁷ els resultats del grau d'inhibició de l'enzim ureasa per part dels metalls pesants, van mostrar una baixa sensibilitat i uns límits de detecció massa elevats per a les necessitats implícites al sistema d'anàlisi proposat (vegeu Annex A).

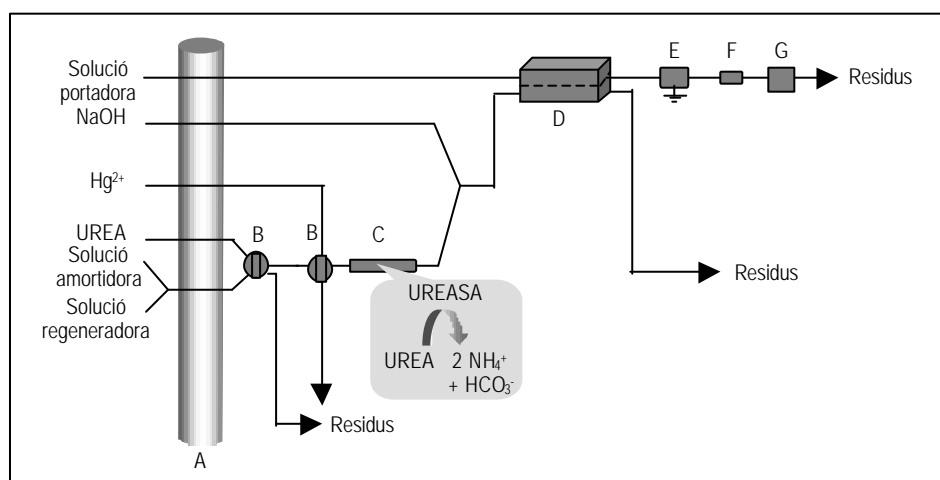


Figura 2.2: Sistema FIA amb detecció potenciomètrica per a la determinació de metalls pesants. (A) Bomba peristàtica; (B) Vòlvules d'injecció; (C) Bioreactor enzimàtic; (D) Difusor de gasos; (E) Elèctrode de presa de terra; (F) Elèctrode selectiu d'ió amoni; (G) Elèctrode de referència.

És per aquest motiu que es va decidir dissenyar el sistema amb detecció amperomètrica que es presenta a la Figura 2.3. Aquest es fonamenta en la seqüenciació d'una segona reacció enzimàtica basada en l'ús de l'enzim *glutamat deshidrogenasa*, a fi de consumir l'ió amoni format, indicador del grau d'inhibició, i d'aquesta manera poder fer un seguiment de la reacció a través del cofactor NADH, atès que es tracta d'una espècie electroactiva, susceptible d'oxidar-se a NAD^+ sobre la superfície electròdica, mitjançant la corresponent cessió d'electrons.

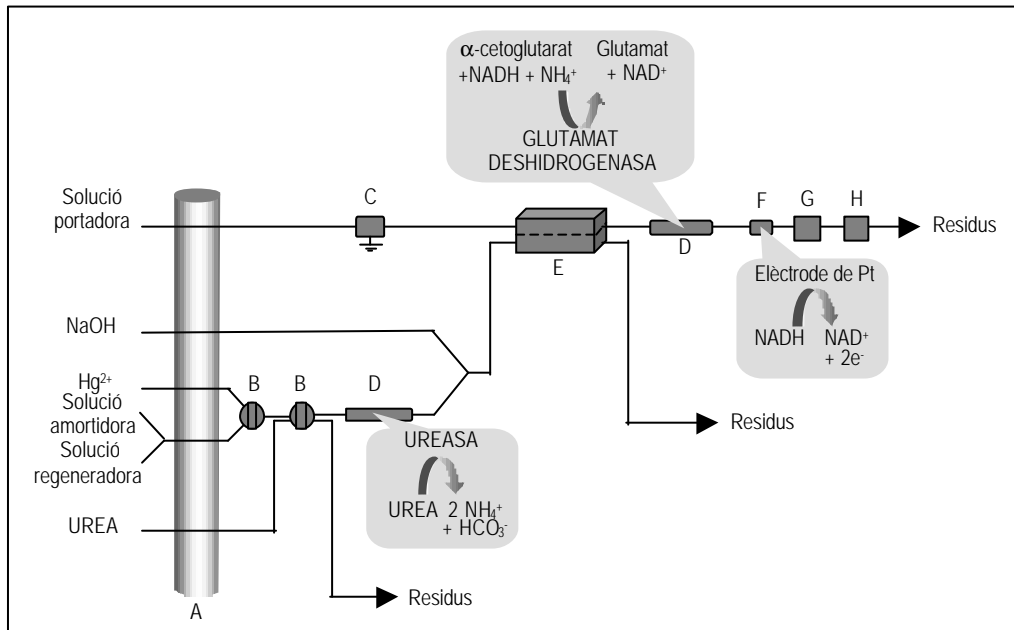


Figura 2.3: Sistema FIA amb detecció amperomètrica per a la determinació de metalls pesants. (A) Bomba peristàtica; (B) Vàlvules d'injecció; (C) Elèctrode de presa de terra; (D) Bioreactors enzimàtics; (E) Difusor de gasos; (F) Elèctrode indicador de platí; (G) Elèctrode auxiliar; (H) Elèctrode de referència.

2.2 EXPERIMENTAL

2.2.1 APARELLS I REACTIUS

2.2.1.1 Aparells

Les mesures voltamperomètriques s'han dut a terme amb un potenciostat Autolab PGSTAT20 (Eco Chemie, Holanda). S'ha emprat un amperímetre LC-4C de la firma comercial BAS (Bioanalytical Inc., USA) per realitzar les mesures d'intensitat de corrent amb aplicació d'un potencial constant. Els registres gràfics d'aquestes mesures amperomètriques en funció del temps s'han obtingut mitjançant la connexió d'un registrador Labograph 517 (Metrohm, Suïssa) al sistema de detecció.

L'elèctrode de referència utilitzat és un elèctrode Orion de doble unió líquida (model 900200), basat en un elèctrode de Ag/AgCl submergit en una solució de clorur de plata saturada, subministrada per la mateixa casa Orion (Ref. 9920201), que actua com a solució de referència interna a fi de proporcionar un potencial constant, igual al d'un *elèctrode de calomelans saturat*. El compartiment exterior de

l'elèctrode de referència s'omple amb una solució de KCl 0.1 M. Com a elèctrode auxiliar s'ha emprat un elèctrode de platí de la firma comercial Ingold (Ref. 108053117).

El sistema de flux està constituït, en primer lloc, per una bomba peristàltica (Gilson, Minipuls 3), que impulsa els líquids a través del sistema com a resultat de la pressió alternant que exerceix sobre els tubs de bomba, que són tubs de silicona (Elkay Products, INC) de diferents diàmetres interns. Els tubs a través dels quals circulen els líquids als sistemes de flux són de tefló (Tecator) amb un diàmetre intern de 0.8 mm. Un altre component del sistema de flux és una vàlvula de sis vies (Ref. 1106, Omnifit, Anglaterra) que fa possible la injecció de diferents volums de mostra. El suport per als elèctrodes i les cel·les adaptables al sistema de flux, totes elles peces de metacrilat de metil, s'han fabricat al taller mecànic de la Universitat Autònoma de Barcelona. Per últim, les connexions entre els tubs i la resta de components del sistema de flux s'aconsegueix amb connectors de PVC, també fabricats al taller mecànic de la pròpia Universitat, que es poden adaptar, mitjançant l'ús de juntes tòriques de Viton (Epidor, S.A.) de 1.78 mm de diàmetre, a fi d'evitar pèrdues dels líquids que circulen pel sistema.

2.2.1.2 Reactius

L'elèctrode de treball de platí consisteix en un fragment rectangular, d'aproximadament 6.0 x 4.0 mm², d'una placa de platí (Ref. PT000251, Goodfellow, Anglaterra) amb una puresa del 99.95 % i un gruix de 0.125 mm, implementat sobre un suport de fibra de vidre (Ariston). El contacte elèctric entre la pista de coure, impresa al suport, i el fragment de platí s'efectua mitjançant una resina conductora de plata, que actua com a soldadura elèctrica, formada per la resina 410E i l'enduridor corresponent (Epoxy Technology). Amb la finalitat d'aïllar les connexions de la solució se'ls aplica un recobriments d'epoxi diacrilat (Ebecril 600, UCB Chemicals).

Com a elèctrode de treball de grafit s'utilitza un determinat tipus de compòsit conductor de grafit de configuració cilíndrica. Aquest compòsit s'obté com a resultat de la mescla d'una resina epòxica, constituïda per la resina Epo-Tek H77 i el corresponent enduridor, subministrats per la firma comercial Epoxy Technology (Billerica, MA, USA), amb partícules de grafit en pols (d'aproximadament 50 µm de grandària) de la casa Merck.

El NAD⁺ i el NADH s'han adquirit a la casa comercial Sigma.

La resta de reactius emprats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

2.2.2 ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE PLATÍ EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH

Inicialment, es va escollir treballar amb un elèctrode de platí per dues raons. En primer lloc, perquè facilita la transferència electrònica i augmenta la conductivitat respecte a un compòsit de grafit, fet que

porta a una millora de la sensibilitat i alhora de la selectivitat, aquesta última com a conseqüència d'una reducció del potencial de treball necessari. I en segon lloc, tot i que a la bibliografia apareixen referències a certes adsorcions no controlades sobre la superfície del platí, sembla ser que la passivació de la superfície no resulta tan evident com la dels elèctrodes de grafit.

2.2.2.1 Construcció d'un transductor de platí de configuració plana

A fi de construir un transductor de platí de configuració plana⁸ (vegeu Figura 2.4), cal disposar d'un suport conductor sobre el qual es pugui implementar el platí. Aquest suport conductor consisteix en una pista de coure fotolitografiada sobre un suport de fibra de vidre. Per a la seva construcció s'ha utilitzat un fotolit que cobreix la part del suport que es vol protegir de l'exposició a la llum ultraviolada (365 nm), a fi d'evitar la degradació de la resina fotodegradable que actua com a recobriments del coure. Així, queda exposada la part del suport on quedarà impresa la pista de coure, sobre la qual s'ha de soldar el fragment de placa de platí, com a conseqüència de la degradació del polímer de recobriments quan es fa incidir llum UV. El contacte elèctric entre el coure i el platí s'ha d'efectuar mitjançant una resina conductora que actua com a soldadura. Es diposita sobre la pista de coure una resina de plata, formada per una mescla homogènia de resina i enduridor en una proporció de 75:4 en pes, respectivament, i es col·loca a sobre la placa de platí. L'elèctrode s'ha de deixar durant 3 dies a una temperatura de 40° C, a fi de permetre el curat de la resina. Finalment, es porta a terme el procés d'encapsulat, dirigit a aïllar les connexions de la solució, així com la resina de plata, susceptible d'ésser oxidada si es troba en contacte amb la solució. Com a encapsulant s'empra una resina epòxica (Ebecril) que cura amb l'exposició a la llum UV. Aquesta resina s'ha de dipositar de manera que només el platí quedi exposat a la solució.

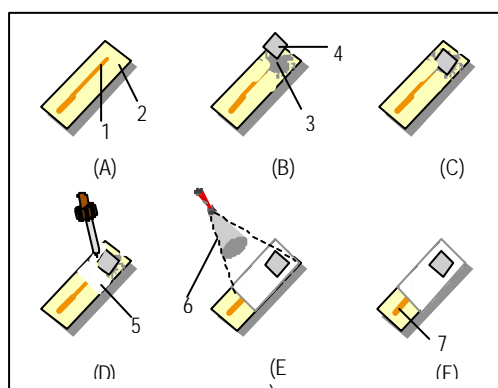


Figura 2.4: Procés de construcció d'un elèctrode de platí de configuració plana. (A) Gravats de les pistes conductores de coure (1) sobre el substrat de fibra de vidre (2); (B) Ús d'una resina conductora de plata (3) com a soldadura entre la placa de platí (4) i la pista de coure; (C) Elèctrode de platí abans d'encapsular; (D) Diposició de la resina epòxica encapsulant (5) a fi d'aïllar les connexions i la resina de plata; (E) Exposició a la llum ultraviolada (6); (F) Elèctrode de platí de configuració plana encapsulat, amb el platí i el contacte elèctric (7) exposats.

2.2.2.2 Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD⁺ sobre la superfície d'un transductor de platí

Per a la caracterització electroquímica del parell redox NADH/NAD⁺ sobre la superfície del transductor de platí construït es fa ús de la voltamperometria cíclica.

L'estudi de la resposta amperomètrica sobre platí d'ambdues espècies es fa per separat. En tots dos casos, el circuit amperomètric està format per tres elèctrodes: un elèctrode de treball (l'elèctrode de platí construït prèviament), un elèctrode auxiliar comercial de platí per tancar el circuit i un elèctrode de referència de Ag/AgCl a fi de controlar el potencial aplicat.

Primer s'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5 i es realitza un cicle de potencial entre -0.1 V i 1.2 V. Tot seguit es canvia el contingut de la cel·la per una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora i es torna a fer un cicle de potencial igual a l'anterior.

Després es repeteix l'experiència, però ara el cicle de potencial va de 0.1 V a -1.2 V i al segon pas, enlloc de NADH, la cel·la electroquímica conté NAD⁺ $2 \cdot 10^{-4}$ M. A fi d'evitar el solapament amb el pic de reducció de l'oxigen (O₂) a aigua, es bombolleja nitrogen (N₂) a ambdues solucions per desplaçar l'oxigen dissolt. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de 50 mV·s⁻¹.

Els voltamperogrames obtinguts permeten fixar el potencial òptim d'oxidació de NADH a NAD⁺ i el de reducció de NAD⁺ a NADH.

2.2.2.3 Estudi de la passivació del transductor de platí durant el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺

A fi de poder avaluar la resposta del transductor de platí vers l'oxidació de NADH, es duu a terme un estudi comparatiu amb un sistema model com és el Fe(CN)₆⁴⁻. Amb aquest objectiu es fan mesures de la intensitat d'oxidació del Fe(CN)₆⁴⁻ i del NADH sobre la superfície d'un elèctrode de platí. Atesa la facilitat d'implementar un elèctrode de configuració plana a un sistema de flux, s'han fet injeccions successives d'ambdues espècies sobre una solució portadora desairejada de tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5. La finalitat d'aquesta experiència ha estat fer un estudi de la repetitivitat, ja que la comparació d'aquest paràmetre pot aportar informació valuosa referent a possibles problemes de passivació de la superfície de l'elèctrode. El volum d'injecció escollit és de 200 µl i el cabal s'ha fixat en 1 ml·min⁻¹. D'altra banda la concentració de les espècies a oxidar, Fe(CN)₆⁴⁻ i NADH, sobre l'elèctrode de platí, és en ambdós casos $5 \cdot 10^{-5}$ M. El sistema de flux monocanal utilitzat (vegeu Figura 2.5) inclou els tres elèctrodes prèviament esmentats (treball, auxiliar i referència), si bé ara l'auxiliar és un compost de grafit-epoxi de configuració tubular, connectats a una unitat amperomètrica que permet fixar el potencial de treball. Aquest potencial a aplicar és 0.260 V en el cas del Fe(CN)₆⁴⁻ i 0.825 V pel NADH.

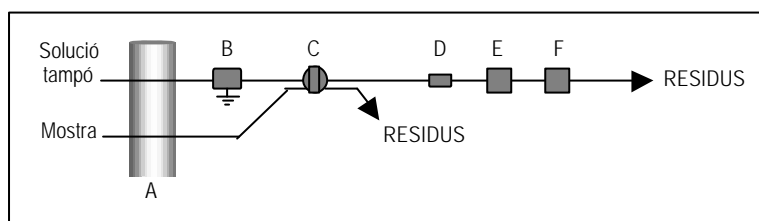


Figura 2.5: Sistema FIA monocanal emprat per a la determinació amperomètrica de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ i de NADH. (A) Bomba peristàltica; (B) Elèctrode de presa de terra; (C) Vàlvula d'injecció; (D) Elèctrode indicador de platí de configuració plana; (E) Elèctrode auxiliar; (F) Elèctrode de referència.

2.2.2.4 Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de platí

Amb l'objectiu d'intentar extreure informació sobre possibles adsorcions de determinades espècies sobre la superfície del transductor, s'efectuen cicles de potencial consecutius a fi de veure la variació entre els diferents voltamperogrames obtinguts.

Els elèctrodes emprats i la velocitat d'escombrat són els descrits a § 2.2.2.2.

Primer s'apliquen cicles de potencial consecutius cap a potencials negatius, entre 0.1 V i -1.2 V, a una cel·la electroquímica que conté tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5. Després es repeteixen els cicles, però quan la cel·la conté una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora. Finalment, sobre aquesta mateixa solució s'aplica un potencial de condicionament de 0.825 V durant 120 s, per després novament fer un cicle de potencial entre els mateixos valors.

Aquesta experiència es repeteix cap a potencials positius, entre -0.1 V i 1.2 V, però ara enlloc d'aplicar un potencial de condicionament a la solució de NADH, es deixa en repòs durant tota una nit i l'endemà es repeteixen els cicles de potencial consecutius.

2.2.3 ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE GRAFIT-EPOXI EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH

Si bé en un principi es va escollir el platí com a elèctrode de treball, es va pensar en una segona opció basada en l'ús de compòsits, és a dir, compostos de grafit en pols aglutinat per una resina epòxica no conductora. Es va estudiar aquesta possibilitat atesa l'experiència del Grup de Sensors i Biosensors (GSB) amb aquest tipus de transductors amperomètrics^{9,10,11,12,13} i pels avantatges¹⁴ que ofereixen:

- ✓ augmenten la relació senyal-soroll respecte als elèctrodes conductors purs, fet que permet obtenir límits de detecció més baixos,

- ✓ són versàtils, tant a l'hora de poder incorporar diferents modificadors a la matriu a fi de millorar les seves característiques electroquímiques, com de manipular el compost abans del seu curat perquè adopti la configuració desitjada,

✓ permeten fer un poliment mecànic de la seva superfície que pot eliminar les alteracions superficials que hagi pogut experimentar el transductor i, per tant, millora el temps de vida del sensor.

2.2.3.1 Construcció d'un transductor basat en un compost de grafit-epoxi

Els transductors basats en composts de grafit-epoxi poden presentar diferents configuracions. En aquest apartat es descriurà com s'ha dut a terme la construcció de transductors de grafit-epoxi de configuració convencional,⁹ destinats a ésser usats en sistemes discrets, i de configuració tubular, adequada per ésser adaptats a cel·les de flux. Atesa la facilitat d'adaptació a qualsevol mottle de la resina que forma el compost abans de l'etapa de curat, el procés de construcció és equivalent per ambdues configuracions, excepte pel que fa al disseny del cos del transductor que ve definit per la configuració requerida.

Construcció del cos del transductor

Per a la construcció del cos d'un transductor de configuració convencional (o cilíndrica) es necessita una connexió elèctrica de 2 mm de diàmetre, a l'extrem de la qual es solda amb estany una làmina de coure circular. Aquesta làmina s'ha rentat prèviament amb àcid nítric a fi d'eliminar la capa d'òxid que es forma amb relativa facilitat sobre les superfícies d'aquest metall.

La connexió elèctrica resultant s'introdueix en un tub cilíndric de PVC de 6 mm de diàmetre intern i 18 mm de longitud. La femella metàl·lica, que porta enroscada la connexió, la fixa a l'interior del cos, de manera que a l'extrem oposat del tub resta disponible una cavitat de 3 mm, on posteriorment s'introduirà el compost preparat, tal com es pot veure a la Figura 2.6.

D'altra banda, per a la construcció del cos d'un transductor de configuració tubular s'utilitza la mateixa connexió elèctrica, però ara s'introdueix perpendicularment en un cos cilíndric de metacrilat de 8 mm de diàmetre intern i 7 mm de longitud, de manera que s'asseguri el contacte amb la resina conductora, tal com s'observa a la Figura 2.7.

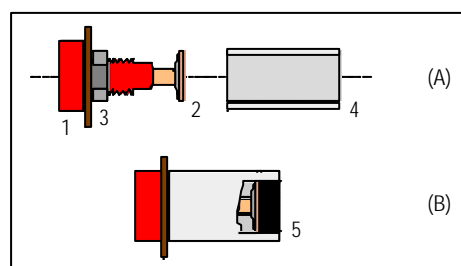


Figura 2.6: Construcció d'un transductor de configuració convencional. (A) Components del cos de l'electrode: Connector elèctric de 2 mm (1), placa circular de coure (2) soldada al connector que porta enroscada una femella metàl·lica que serveix per a la fixació a l'interior del tub (3) i tub de PVC (6 mm de diàmetre intern i 18 mm de llargada) (4); (B) Transductor de configuració convencional. Per als transductors basats en composts de grafit-epoxi l'espai cilíndric de 3 mm de diàmetre que queda a l'extrem del cos (5) s'omple amb una resina conductora de grafit-epoxi.

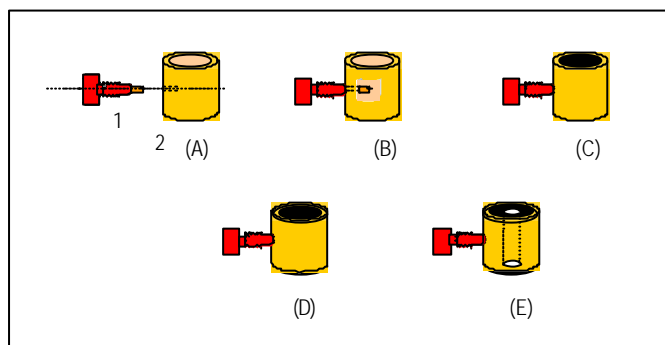


Figura 2.7: Construcció d'un transductor de configuració tubular. (A) Acoblament d'un connector elèctric de 2 mm (1) a un cilindre de metacrilat (7 mm de longitud i 8 mm de diàmetre intern) (2); (B) Cos de l'elèctrode; (C) Ompliment de l'espai interior del cos de l'elèctrode amb la resina conductora de grafit; (D) Aïllament mitjançant una resina epòxica encapsulant; (E) Transductor de configuració tubular amb un orifici central de 0.5 mm de diàmetre.

Preparació i curat del compòsit de grafit-epoxi

Per a ambdues configuracions, el compòsit conductor de grafit-epoxi que ha d'omplir les cavitats dels cossos preparats s'obté com a resultat de la mescla homogènia de grafit en pols amb la resina epòxica Epo-Tek H77 en una relació 1:4 en pes. Aquesta resina està constituïda per dos components: la pròpia resina i l'enduridor, en una proporció de 20:3 parts en pes, respectivament.

Un cop ben homogeneïtzada la pasta, s'introdueix a les cavitats dels cossos cilíndrics o tubulars i es deixa curar durant una setmana a l'estufa a una temperatura de 35-40° C.

Transductors de configuració convencional

Un cop curats, s'humiteja la superfície del compòsit i es poleix, primer amb paper de vidre fi i després amb paper d'alúmina de 3 µm (*polishing strips* 301044-001, Orion). Aquest procés de poliment es pot utilitzar com a estratègia per regenerar la superfície del sensor després del seu ús, eliminant d'aquesta manera la història prèvia de l'elèctrode.

Transductors de configuració tubular

En aquest cas, després del procés de curat del compòsit, es cobreixen ambdues cares del transductor amb una resina aïllant (Araldit HY5162, en una proporció de resina i enduridor de 5:2 en pes) que protegeix el contacte intern conductor de la solució, que s'ha de deixar curar 12 hores més a 40° C. Per últim, es realitza un forat central de 0.5 mm de diàmetre, per on passaran les solucions del sistema de flux a fi que puguin entrar en contacte amb la superfície del compòsit.

2.2.3.2 Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD⁺ sobre la superfície d'un transductor de configuració convencional basat en un compòsit de grafit-epoxi

Com en el cas del transductor de platí, es fa ús de la voltamperometria cíclica a fi de caracteritzar electroquímicament el parell redox NADH/NAD⁺. En aquest cas s'empra el mateix disseny experimental descrit a § 2.2.2.2, excepte pel que fa a l'elèctrode de treball, que ara correspon a un elèctrode de configuració convencional basat en un compòsit de grafit-epoxi.

Amb l'objectiu d'estudiar la resposta amperomètrica sobre un compòsit de grafit de les espècies NADH i NAD⁺, es porten a terme dues experiències per separat.

En primer lloc, es realitzen dos cicles de potencial entre -0.1 V i 1.2 V, un quan la cel·la electroquímica conté tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5 i l'altre quan es canvia el contingut de la cel·la per una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-5}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora.

Després es repeteix l'experiència, però ara el cicle de potencial va de 1.4 V a -1.6 V i al segon pas, enlloc de NADH, la cel·la electroquímica conté NAD⁺ $5 \cdot 10^{-4}$ M. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de 50 mV·s⁻¹.

Els voltamperogrames obtinguts proporcionen la informació necessària per fixar el potencial òptim d'oxidació de NADH a NAD⁺ i el de reducció de NAD⁺ a NADH.

2.2.3.3 Estudi de la passivació del transductor de configuració convencional basat en un compòsit de grafit-epoxi durant el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺

La representació de corbes de calibració successives, obtingudes amb un mateix elèctrode de treball en les mateixes condicions, pot ésser un bon indicador de l'existència de problemes de passivació a la superfície que s'observarien com a una pèrdua continuada de sensibilitat entre corbes consecutives. És per aquest motiu que s'ha decidit fer mesures de la intensitat d'oxidació del NADH sobre la superfície del compòsit de grafit en sistemes discrets.

S'aplica un potencial de 0.8 V a una cel·la electroquímica que conté un volum de 10 ml de tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5, en agitació constant, on estan submergits el compòsit de grafit que actua com a elèctrode de treball, l'elèctrode auxiliar i l'elèctrode de referència. Un cop s'assoleix l'estabilització del sistema, es fan addicions de microvolums d'una solució de NADH 0.01 M. L'agitació constant afavoreix el transport per convecció de l'espècie electroactiva des del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode, mentre que l'addició de microvolums implica un grau de dilució menyspreable.

2.2.3.4 Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi

Es repeteix, com en el cas del transductor de platí (vegeu § 2.2.2.4), l'estudi basat en efectuar cicles de potencial consecutius a fi d'extreure informació dels voltamperogrames obtinguts sobre possibles adsorcions a la superfície del compost de grafit. No obstant això, l'estudi realitzat en aquest apartat ha estat més exhaustiu que el dut a terme pel transductor de platí, atès que a la bibliografia es troben estudis molt detallats¹⁵ sobre les possibles adsorcions que experimenten els elèctrodes de grafit. Malgrat això, cal tenir present que el comportament d'un compost de grafit-epoxi pot diferir notablement del d'un elèctrode de grafit vitrificat o de grafit pirolític.

Totes les experiències s'han dut a terme en una cel·la electroquímica que conté un volum de 10 ml de solució, on es troben submergits els elèctrodes emprats en els dos apartats precedents. Les solucions que s'han utilitzat per a cada cicle de potencial han estat: tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i diverses solucions de NADH i de NAD⁺ de diferents concentracions, preparades amb la mateixa solució amortidora. Amb l'objectiu de netejar la superfície de l'elèctrode de qualsevol possible adsorció, com a pas previ de totes les mesures efectuades, s'ha realitzat un pretractament de l'elèctrode,¹⁵ que consisteix en un condicionament basat en 15 cicles consecutius de potencial entre 1.5 V i -1.5 V a una velocitat d'escombrat de 0.1 V·s⁻¹, seguit de l'aplicació d'un potencial de 1.5 V durant 2 min i de -1.5 V durant 2 min més, a fi d'oxidar i reduir qualsevol espècie que es pugui haver adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode. Aquest darrer pas es repeteix dues vegades. Finalment, es deixen establir els elèctrodes en la solució de treball a un potencial de 0 V durant 2 min abans de fer les mesures.

Per a les diferents experiències la velocitat d'escombrat s'ha anat variant, amb l'objectiu de poder extreure la màxima informació possible dels voltamperogrames que en resulten.

2.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.3.1 ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE PLATÍ EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH

Si bé a la bibliografia està descrit l'ús del platí com a elèctrode de treball per a l'oxidació directa de NADH, a continuació es mostraran resultats que demostren els problemes de passivació que s'han detectat quan es treballa amb aquest tipus de transductors un cop ja han estat emprats prèviament per detectar NADH. Aquesta dificultat a l'hora de treballar amb elèctrodes de platí s'ha fet palesa als nostres laboratoris, no només en anàlisis amperomètriques de NADH, sinó també en la determinació d'altres espècies electroactives.¹⁶

2.3.1.1 Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/NAD⁺ sobre la superfície d'un transductor de platí

A la Figura 2.8(A) es poden comparar els voltamperogrames obtinguts, entre -0.1 V i 1.2 V, per a una solució de tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5 i per a una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora. D'ells se n'extreu que el potencial òptim d'oxidació de NADH a NAD⁺ sobre un transductor de platí es troba entre 0.7 i 0.8 V.

De la mateixa manera, a la Figura 2.8(B) estan representats els cicles de potencial de 0.1 V a -1.2 V corresponents a la mateixa solució amortidora i a una solució de NAD⁺ $2 \cdot 10^{-4}$ M. De la seva comparació se n'extreu que la intensitat del pic de reducció que apareix als voltants de -0.8 V pràcticament no varia, fet que porta a pensar que es tracta d'un pic de reducció propi d'alguna espècie electroactiva diferent del NAD⁺, present inicialment a ambdues solucions. Si a més, es té en compte que a la bibliografia es recullen valors de potencial de reducció de NAD⁺ a NADH més negatius que -0.8 V,^{3,15} sembla correcte suposar que possiblement el pic de reducció de NAD⁺ a NADH es troba solapat amb la reducció del dissolvent, essent impossible la seva identificació.

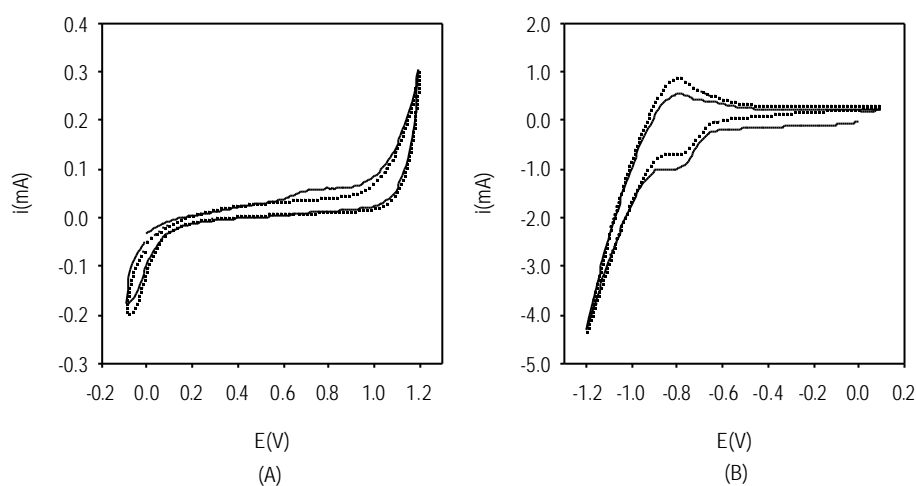


Figura 2.8: Voltamperogrames cíclics (A) d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M i (B) d'una solució de NAD⁺ $2 \cdot 10^{-4}$ M, obtinguts quan s'utilitza un elèctrode indicador de platí de configuració plana. En ambdós casos, la línia de punts representa la intensitat mesurada com a resultat de l'escombrat de potencial per l'electròlit suport (tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5), mentre que la línia contínua mostra la resposta en presència de (A) NADH i (B) NAD⁺. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3.1.2 Estudi de la passivació del transductor de platí durant el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺

Atès que el que interessa, a fi d'estudiar la passivació de l'elèctrode de platí en relació a l'oxidació del NADH, és comprovar si es manté constant el valor de la intensitat d'oxidació després de varies

mesures, es compara la repetitivitat obtinguda en un sistema de flux quan es fan injeccions successives de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ i de NADH sobre una solució portadora desairejada de tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5 (vegeu Figura 2.9). La desviació estàndard relativa per vint injeccions successives d'una solució de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ $5 \cdot 10^{-5}$ M és del 0.5 %, mentre que pel mateix número d'injeccions successives de NADH $5 \cdot 10^{-5}$ M és del 10 %, fet que fa palès un enverinament progressiu del platí com a conseqüència del procés d'oxidació del NADH que té lloc a la seva superfície. En base a la pèrdua d'intensitat observada a la Figura 2.9, per injeccions successives de NADH, es creu adient parlar de passivació del transductor de platí.

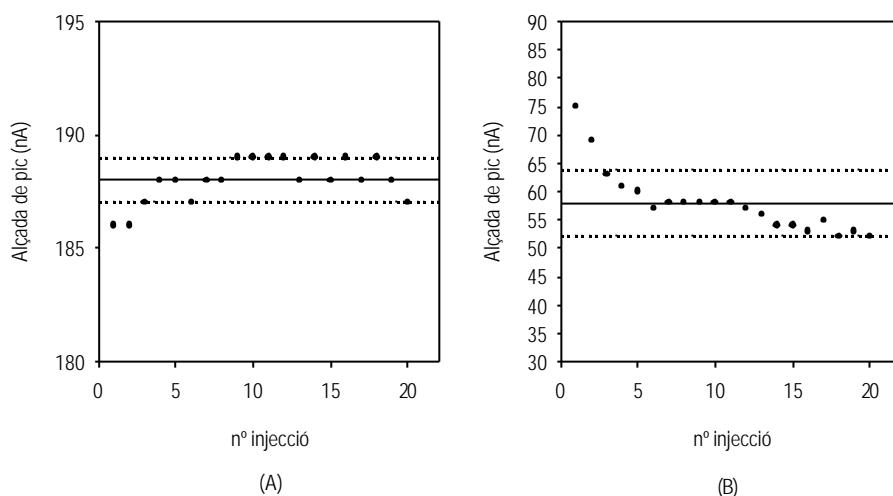


Figura 2.9: Estudi de la repetitivitat del senyal en un sistema de flux quan es fan 20 injeccions successives (A) d'una solució de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ $5 \cdot 10^{-5}$ M i (B) d'una solució de NADH $5 \cdot 10^{-5}$ M, sobre una mateixa solució portadora (tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5) desairejada. S'ha emprat un elèctrode pla de platí com a elèctrode de treball. Els potencials aplicats han estat (A) 0.260 V i (B) 0.825 V. En ambdós casos, la línia sòlida representa la mitjana, mentre que les línies de punts corresponen a la suma i la resta de la desviació estàndard.

2.3.1.3 Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de platí

La informació sobre les alteracions que experimenta la superfície d'un elèctrode continguda als voltamperogrames, tot i ésser molt àmplia, sovint resulta molt complicada d'interpretar. Per aquest motiu, s'ha intentat avaluar només les zones dels voltamperogrames que s'ha cregut que poden contenir informació referent a processos que impliquen el parell NADH/NAD⁺ i productes intermedis del procés de conversió d'una espècie en l'altra.

A la Figura 2.10(A), malgrat que no s'hauria d'observar cap canvi entre els voltamperogrames corresponents a l'electròlit suport i a la solució de NADH, degut a que no s'arriben a potencials prou positius com per oxidar el NADH a NAD⁺ i que aquest es redueixi després per tornar a NADH, es veu una disminució dels dos pics anòdics per a la solució de NADH. Es podria pensar que aquests pics

anòdics corresponen a algun complex format amb el platí que altera la superfície de l'elèctrode, ja que a la solució inicial (tampó fosfat amb KCl) no hi ha present cap espècie de per si electroactiva. Atès que la solució sempre s'agita abans d'enregistrar tots els voltamperogrames a fi d'evitar disminucions d'alçada de pic degudes a que no arriba suficient espècie electroactiva a la superfície de l'elèctrode per difusió, la disminució dels dos pics anòdics en presència de NADH porta a pensar en algun tipus d'alteració de la superfície, o dels complexos responsables de la intensitat de pic.

Tal com s'observa a la Figura 2.10(A), l'aplicació d'un potencial de condicionament de 0.825 V comporta la recuperació de la intensitat dels dos pics anòdics i un augment de l'alçada del pic catòdic. En relació a la restauració de les intensitats dels pics anòdics inicials es pot suposar que s'ha produït l'oxidació d'alguna espècie adsorbida sobre la superfície del platí que dificultava la transferència electrònica entre el platí i les espècies electroactives presents a la solució. D'altra banda, l'augment del pic catòdic no queda clar que es pugui relacionar amb el parell NADH/NAD⁺. Si bé es podria pensar que, com a resultat de l'aplicació d'un potencial d'oxidació, part del NADH s'ha oxidat a NAD⁺, susceptible d'ésser reduït quan s'avança cap a valors de potencial negatius i provocar així un augment de la intensitat catòdica, el fet que el pic ja s'observi inicialment per a la solució amortidora sense NADH sembla ésser coherent amb la idea del solapament d'aquest possible pic amb el corresponent a la reducció de NAD⁺ a NADH, fent impossible l'estudi d'aquest darrer.

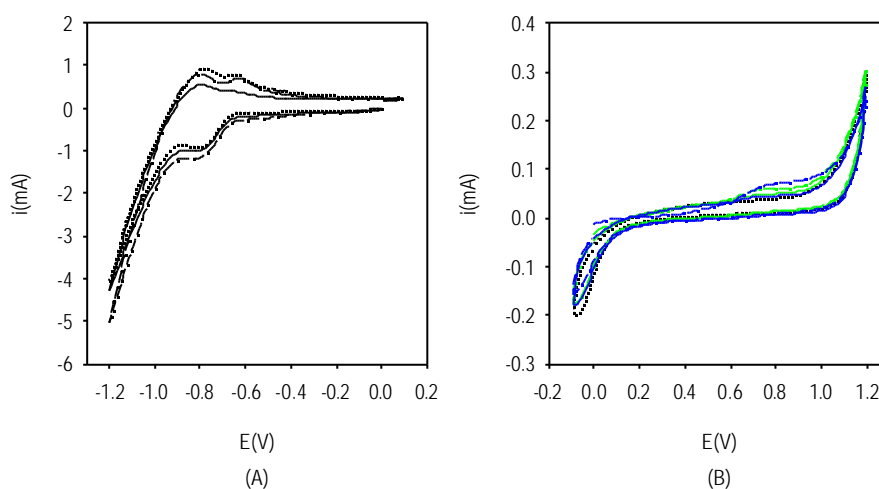


Figura 2.10: Voltamperogrames cíclics d'una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M quan s'utilitza un elèctrode indicador de platí de configuració plana. En ambdós casos, la línia de punts mostra el voltamperograma de l'electròlit suport. Al gràfic (A) la línia contínua correspon a la solució de NADH i la discontinua a aquesta mateixa solució després d'haver aplicat un potencial de condicionament de 0.825 V durant 120 s. Al gràfic (B) les línies discontinúes representen el primer voltamperograma d'una sèrie de cicles consecutius per a la solució de NADH, mentre que les contínues representen l'últim d'aquests voltamperogrames. El color de les línies serveix per diferenciar entre els voltamperogrames de la solució acabada de preparar (línies verdes) i els obtinguts amb la mateixa solució un dia després (línies blaves). Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Als voltamperogrames registrats entre -0.1 V i 1.2 V, que es mostren a la Figura 2.10(B), s'observa un *plateau*, corresponent a l'oxidació de NADH a NAD^+ , que perd alçada quan es fan cicles consecutius, fet que es podria atribuir a que no arriba a la superfície del platí una quantitat d'espècie suficient per mantenir un valor de intensitat constant. Ara bé, el desplaçament del potencial d'oxidació cap a valors més positius, que es fa evident en cicles consecutius, és conseqüència d'algun procés que dificulta la transferència electrònica entre el NADH i l'elèctrode, fet que es pot relacionar amb la passivació de la superfície com a resultat de l'adsorció d'algun dels productes obtinguts de l'oxidació del NADH.

2.3.2 ESTUDI DEL COMPORTAMENT D'UN TRANSDUCTOR DE GRAFIT-EPOXI EMPRAT EN LA DETECCIÓ AMPEROMÈTRICA DIRECTA DE NADH

Atès els inconvenients que presenta el platí com a elèctrode de treball, especialment pel que fa referència a la passivació de la seva superfície, es va pensar en l'opció de treballar amb composts de grafit-epoxi. Inicialment, amb la finalitat de conèixer el seu comportament vers possibles adsorcions, es va fer un estudi de la seva passivació basat en referències bibliogràfiques¹⁵ referents a grafit vitrificat, atès que el comportament d'aquest vers l'oxidació de NADH està descrit amb detall.

2.3.2.1 Caracterització dels processos d'oxidació i reducció del parell NADH/ NAD^+ sobre la superfície d'un transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi

La Figura 2.11(A) mostra els voltamperogrames obtinguts per a tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5 i per a una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-5}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora, quan es realitza un cicle de potencial entre -0.1 V i 1.2 V. S'observa com el potencial òptim d'oxidació de NADH a NAD^+ sobre un transductor basat en un compost de grafit-epoxi és, aproximadament, 0.8 V.

A la Figura 2.11(B) estan representats els cicles de potencial de 1.4 V a -1.6 V que corresponen a la mateixa solució amortidora i a una solució de NAD^+ $5 \cdot 10^{-4}$ M preparada amb aquest mateix tampó. Aquests voltamperogrames indiquen que el potencial de reducció del NAD^+ a NADH sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi correspon a -1.2 V, atès que aquest pic només apareix quan la solució conté NAD^+ . Per altra banda, el pic que s'observa al voltant de -0.7 V per ambdós voltamperogrames, prové de la reducció de l'oxigen dissolt per donar H_2O_2 , ja que en aquest cas les solucions no s'han desairejat.

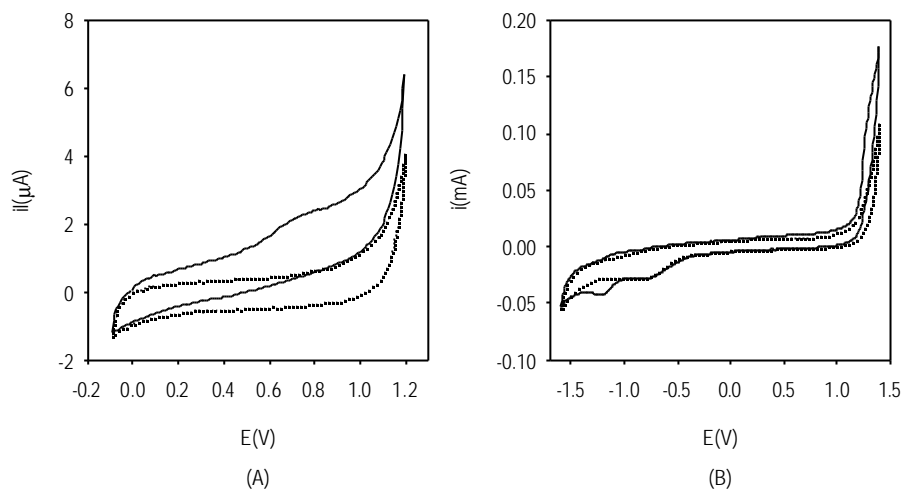


Figura 2.11: Voltamperogrames cíclics (A) d'una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-5}$ M i (B) d'una solució de NAD⁺ $5 \cdot 10^{-4}$ M, obtinguts quan s'utilitza un elèctrode de treball de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi. En ambdós casos, la línia de punts correspon al voltamperograma de l'electròlit suport (tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5), mentre que la línia contínua mostra els pics (A) d'oxidació de NADH i (B) de reducció de NAD⁺. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3.2.2 Estudi de la passivació del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi durant el procés d'oxidació de NADH a NAD⁺

A la Figura 2.12 es comparen les corbes de calibració successives obtingudes de l'oxidació de NADH sobre un mateix compost de grafit-epoxi, en tots els casos sota les mateixes condicions. El potencial aplicat a l'elèctrode indicador és de 0.8 V, i no es realitza cap tractament entre calibratges consecutius.

S'esperaria que aquestes corbes diferissin molt poc les unes de les altres, però no és així. Ans al contrari, esdevé evident una pèrdua continuada de la sensibilitat per calibratges successius, que confirma l'existència de problemes de passivació de la superfície del compost de grafit vers l'oxidació de NADH.

A la Taula 2.1 es recullen els paràmetres de calibració per a cadascuna de les corbes de calibració, entre els quals cal destacar els valors decreixents de sensibilitat entre corbes consecutives.

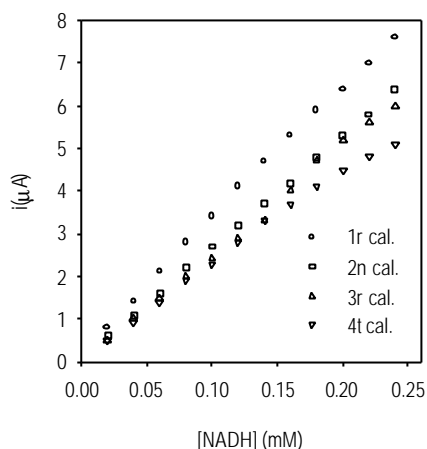


Figura 2.12: Corbes de calibració successives obtingudes de l'oxidació de NADH quan s'utilitza com a elèctrode de treball un transductor convencional basat en un compost de grafit-epoxi. L'electròlit suport és també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. El potencial de treball ha estat 0.8 V.

Taula 2.1: Paràmetres de calibració avaluats a partir de corbes de calibració successives obtingudes com a resposta d'un compost de grafit-epoxi a addicions de NADH. Els paràmetres corresponen a l'ajust lineal de les dades experimentals representades a la Figura 2.12. Els límits de confiança inclosos s'han calculat com a $\pm t \cdot s$, on s'ha emprat un valor de t corresponent a un nivell de confiança del 95% i s és la desviació estàndard associada a l'ordenada en l'origen i al pendent, respectivament.

| CORBA DE CALIBRACIÓ | ORDENADA EN L'ORIGEN (μA) | PENDENT ($\mu\text{A}/\text{mM}$) | COEFICIENT DE REGRESSIÓ |
|---------------------|--|-------------------------------------|-------------------------|
| 1a | 0.27 ± 0.09 | 30.9 ± 0.6 | 0.9993 |
| 2a | 0.06 ± 0.03 | 26.2 ± 0.2 | 0.9999 |
| 3a | -0.07 ± 0.05 | 25.6 ± 0.7 | 0.9983 |
| 4a | 0.14 ± 0.11 | 21.5 ± 0.7 | 0.9978 |

2.3.2.3 Estudi de les possibles adsorcions sobre la superfície del transductor de configuració convencional basat en un compost de grafit-epoxi

El coneixement del mecanisme que segueix l'oxidació electroquímica del NADH sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi, és un pas indispensable per poder controlar les adsorcions. Els resultats mostrats a continuació s'han fonamentat en un estudi publicat sobre les adsorcions que experimenta el grafit vitrificat quan actua com a elèctrode de treball.¹⁵

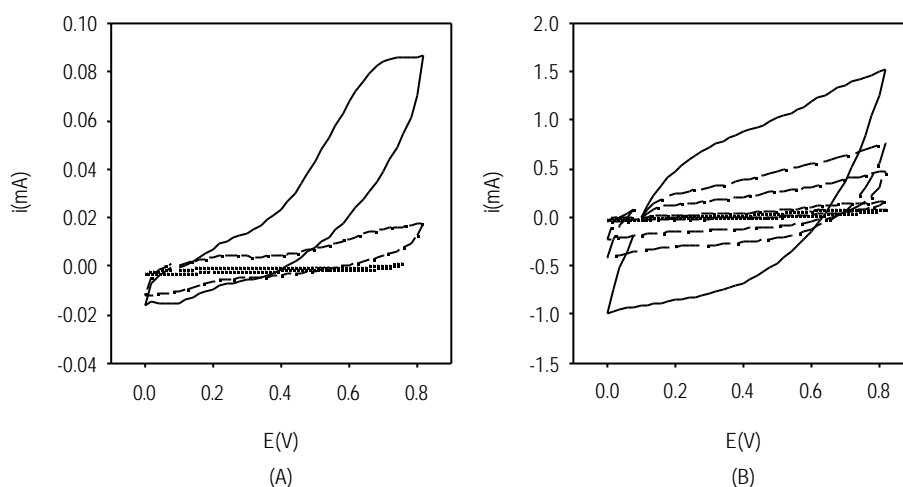


Figura 2.13: Voltamperogrames cíclics que corresponen a una solució de NADH 1 mM i NAD^+ 2mM quan s'utilitza un transductor basat en un compost de grafit-epoxi com a elèctrode de treball. Al gràfic (A) la línia de punts representa el voltamperograma de l'electròlit suport (tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5), mentre que les altres dues línies mostren el primer cicle per a la solució que conté el parell redox NADH/NAD (línia contínua) i el que s'obté un cop s'ha arribat a l'estat estacionari (línia discontinua). La velocitat d'escombrat per a aquests 3 voltamperogrames ha estat de $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Al gràfic (B) es mostren els voltamperogrames per a la mateixa solució (NADH 1 mM i NAD^+ 2 mM), però per a diferents velocitats d'escombrat, que van seqüencialment des de $30 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (línia contínua) fins a $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (línia de punts). Entremig les velocitats d'escombrat han estat: 10, 5 i $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

A la Figura 2.13(A) apareixen els voltamperogrames corresponents a un elèctrode basat en un compost de grafit-epoxi pretractat electroquímicament, per a una solució de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i per a una solució que conté NADH 1 mM i NAD^+ 2mM. En ambdós casos la velocitat d'escombrat de potencial és de $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Per a la solució que conté el parell NADH/ NAD^+ s'han representat dos voltamperogrames: el corresponent al primer cicle de potencial efectuat (línia contínua) i l'obtingut quan ja no s'observen variacions (línia discontinua). Inicialment, la pèrdua d'intensitat del pic anòdic observada, es podria atribuir a una manca d'aportament d'espècie electroactiva cap a la superfície de l'elèctrode provocada per un transport per difusió poc efectiu. No obstant això, l'aplicació d'un període d'agitació previ a cada mesura assegura l'eficiència d'aquest transport, de manera que es pot associar la disminució de la intensitat anòdica a l'adsorció, sobre la superfície de l'elèctrode, d'alguna espècie generada durant el procés d'oxidació que dificulta la transferència electrònica entre l'elèctrode i les espècies electroactives en solució.

L'aparició d'una pre-ona d'oxidació al voltant de 0.3 V, seguida del *plateau* situat entre 0.7 V i 0.8 V que s'atribueix pròpiament al procés d'oxidació de NADH a NAD^+ , porta a pensar en la possibilitat que l'oxidació del NADH estigui controlada per dos processos diferents: un primer procés controlat per l'adsorció de NAD^+ sobre l'elèctrode i un segon controlat per la difusió de les espècies presents a la solució cap a la superfície del compost. Això s'ha intentat corroborar mitjançant la representació dels

valors d'intensitat anòdica a 0.3 V i a 0.7 V, obtinguts dels voltamperogrames resultants dels cicles de potencial duts a terme per la solució de NADH 1 mM i NAD^+ 2mM a diferents velocitats d'escombrat de potencial (vegeu Figura 2.13(B)).

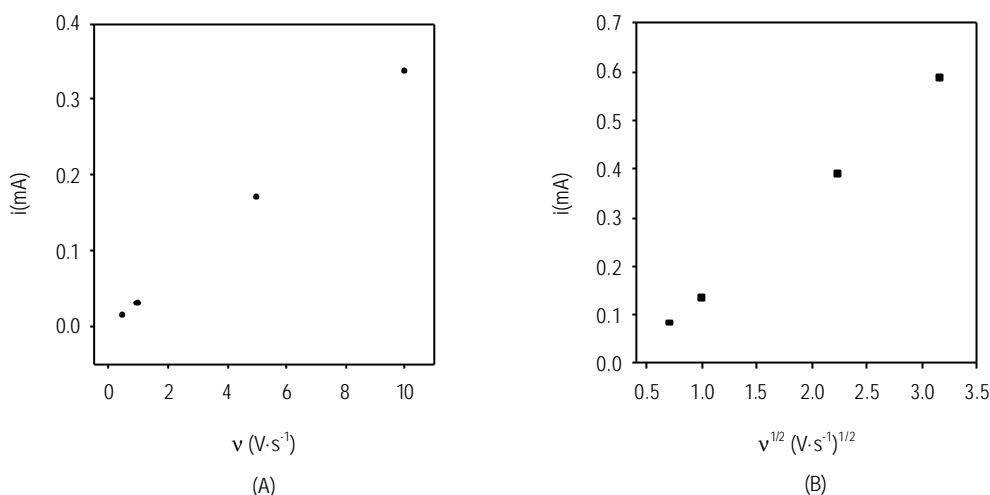


Figura 2.14: Representació dels valors d'intensitat anòdica (A) en funció de v a 0.3 V i (B) en funció de $v^{1/2}$ a 0.7 V. Les dades experimentals s'han extret dels voltamperogrames representats a la Figura 2.13.

D'acord amb la teoria descrita a § 1.3.1.4, quan la intensitat mesurada és proporcional a la velocitat d'escombrat de potencial (v), es parla d'un recobriment superficial, propi d'una capa prima possiblement obtinguda per adsorció. Mentre que els casos en què la intensitat és proporcional a $v^{1/2}$, corresponen a processos controlats per difusió.¹⁷ Així, com a resultat de l'intent de representar els valors d'intensitat a 0.3 V i 0.7 V en funció de v , o bé de $v^{1/2}$, s'observa a la Figura 2.14 que el millor ajust lineal porta a poder dir que la pre-ona situada a 0.3 V és proporcional a v i, per tant, en aquest punt el procés està controlat per l'adsorció del NAD^+ , present inicialment a la solució, sobre el compost de grafit i que l'oxidació de NADH pròpiament dita, que es dona a 0.7 V està controlada per la difusió, ja que els valors de intensitat obtinguts en aquesta zona depenen linealment de $v^{1/2}$.

A la Figura 2.15(A) es mostren els voltamperogrames obtinguts quan es submergeix, en tampó fosfat desoxigenat, l'elèctrode després d'haver estat sotmès als tractaments descrits per a la Figura 2.13(A). L'aparició al primer cicle d'una ona de reducció, al voltant de -1.2 V, que desapareix als cicles següents, sembla confirmar la idea que la superfície del compost s'havia anat recobrint de molècules de NAD^+ adsorbides fins arribar a un estat de saturació. Atès que ara a la solució no hi ha NAD^+ present, aquesta intensitat catòdica s'atribueix a la reducció del NAD^+ adsorbit prèviament. Aquesta reducció pot ser a NAD^+ , mitjançant un procés de captació d'un electró, o bé directament a NADH, procés que requereix la captació de 2 electrons.¹⁸

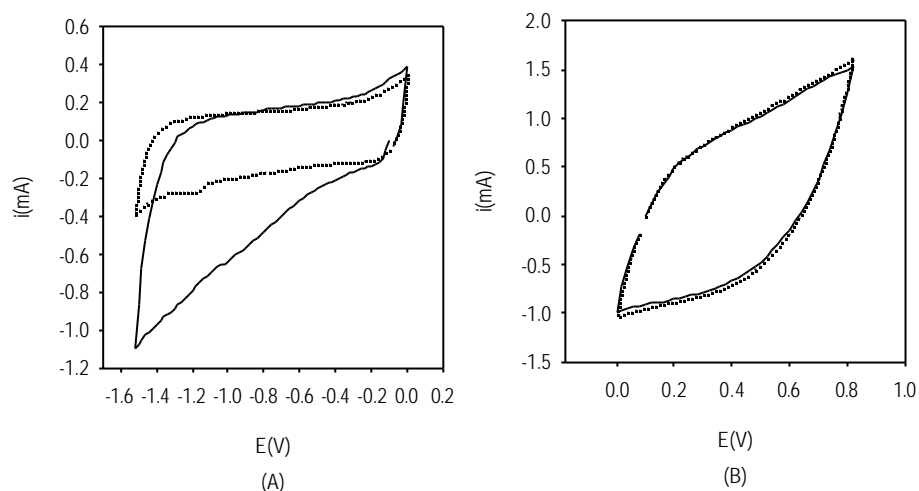
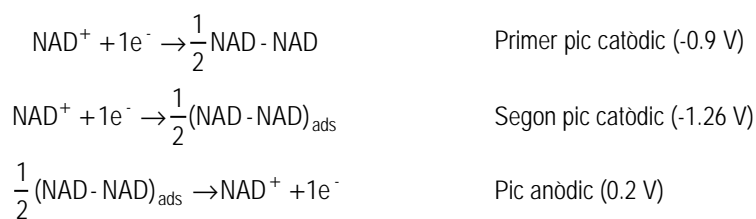


Figura 2.15: Voltamperogrames cíclics obtinguts amb un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi, amb el qual, prèviament, s'han fet cicles de potencial consecutius a una solució de NADH/NAD⁺ fins arribar a un estat en què ja no es produeixen variacions. Al gràfic (A) es representen el primer (línia contínua) i l'últim (línia de punts) voltamperogrames obtinguts amb aquest elèctrode, quan s'empra una solució amortidora de pH (fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5) desairejada. La velocitat d'escombrat ha estat 5 V·s⁻¹. Al gràfic (B) es mostra el voltamperograma que correspon a una solució de NADH/NAD⁺ amb l'elèctrode esmentat, després de sotmetre'l a un potencial de 0 V durant un període de temps de més d'una hora (línia de punts), i amb un compost de grafit-epoxi net (línia contínua). En aquest cas la velocitat d'escombrat ha estat de 30 V·s⁻¹.

D'altra banda, si es compara el voltamperograma obtingut després de l'aplicació d'un potencial de 0 V durant més d'una hora a aquest mateix elèctrode amb NAD⁺ adsorbit a la seva superfície, amb el voltamperograma corresponent al primer cicle, per a una mateixa solució, amb l'elèctrode net, es fa palès el solapament d'ambdós voltamperogrames, fet que indica que el NAD⁺ experimenta un procés de desorció a potencials inferiors a 0 V (vegeu Figura 2.15(B)).

*Moiroux et al.*¹⁵ proposen les següents reaccions electroquímiques per a l'estudi basat en l'obtenció d'un voltamperograma cíclic d'una solució de NAD⁺ electrolitzada, quan s'empra un elèctrode de grafit vitrificat com a elèctrode de treball:



Per a la mateixa experiència, però realitzada amb un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi (vegeu Figura 2.16) s'observa que els resultats experimentals obtinguts no contradiuen aquest model.

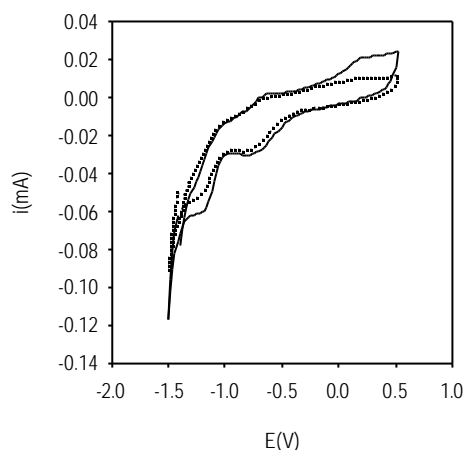


Figura 2.16: Voltamperogrames cíclics que corresponen a una solució de NAD^+ 1 mM electrolitzada, obtinguts amb un compost de grafit-epoxi net (línia contínua) i amb un altre que s'ha sotmès a l'aplicació de cicles consecutius, submergit a una solució de NADH/NAD^+ , fins assolir un estat en què ja no es produeixen variacions (línia de punts). La velocitat d'escombrat ha estat $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Així, com a resultat del procés d'electròlisi aplicat a una solució de NAD^+ 1 mM, s'obté una solució amb una concentració important del dímer NAD-NAD . Els voltamperogrames que es mostren a la Figura 2.16 que corresponen a un elèctrode net (sense cap tractament previ) i a un elèctrode amb NAD^+ adsorbit prèviament a la seva superfície, permeten obtenir informació sobre quines són les espècies amb més predisposició per ésser adsorbides. Així, la desaparició del pic anòdic quan hi ha NAD^+ fortament adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode indica que l'adsorció del dímer no es fa efectiva si ja hi ha NAD^+ adsorbit. A més, per a aquest mateix voltamperograma, el desplaçament dels pics catòdics cap a potencials lleugerament més negatius respon a l'impediment d'una transferència electrònica àgil, dificultada per les molècules de NAD^+ que cobreixen la superfície de l'elèctrode.

La variació de la velocitat d'escombrat quan es fan cicles de potencial en una solució de NAD^+ 1 mM, com en el cas d'una solució de treball amb NADH i NAD^+ , és d'ajut alhora de reconèixer si un procés està controlat per difusió o per adsorció (vegeu § 1.3.1.4).¹⁷ Així, de les dades d'intensitat obtingudes a partir dels voltamperogrames de la Figura 2.17(A), es pot concloure que només el procés que correspon al segon pic catòdic ($E \approx -1.2 \text{ V}$) és proporcional a $v^{1/2}$ i, per tant, és l'únic controlat per difusió. Això està d'acord amb el fet que és l'únic procés que no s'associa a espècies adsorbides. Per últim, i relacionat amb el que s'acaba de dir, es pot observar a la Figura 2.17(B) com el pic esmentat és

l'únic que varia la seva intensitat amb la variació de la concentració de NAD^+ en solució, mentre que la resta del voltamperograma es manté, atès que depèn de l'adsorció del dímer sobre l'elèctrode.

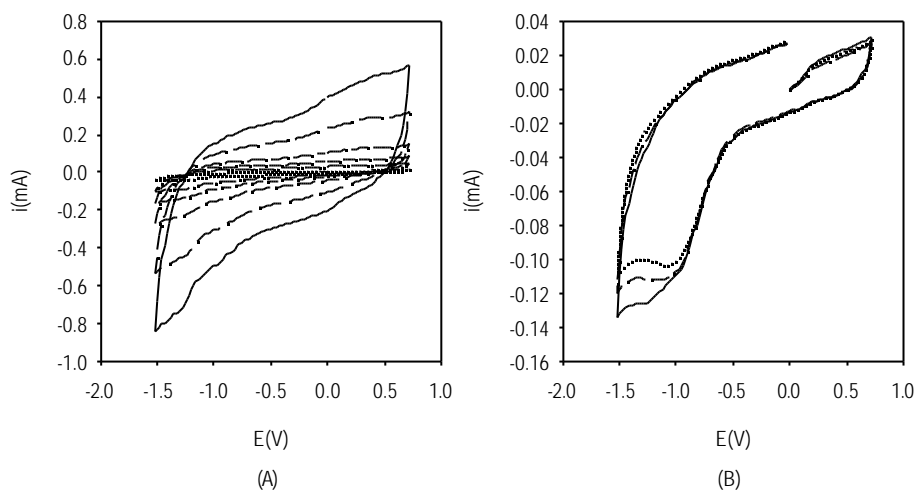


Figura 2.17: Voltamperogrames cíclics que corresponen a una solució de NAD^+ 1 mM quan s'utilitza un compost de grafit-epoxi com a elèctrode de treball. Al gràfic (A) es mostren els voltamperogrames obtinguts per a diferents velocitats d'escombrat, des de $10 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (línia contínua) fins a $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (línia de punts). Els voltamperogrames situats entre aquests dos corresponen seqüencialment a les següents velocitats d'escombrat: 5, 2, 1, $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Al gràfic (B) s'han representat voltamperogrames obtinguts en les mateixes condicions, però per a diferents concentracions de la solució de NAD^+ . Aquestes concentracions són: 0.5 mM (línia contínua) i 0.1 mM (línia discontinua), mentre que la línia de punts correspon al voltamperograma de la solució de base (tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M pH 6.5) sense NAD^+ . La velocitat d'escombrat per a aquests tres voltamperogrames ha estat de $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.4 CONCLUSIONS

D'aquest capítol es poden treure les següents conclusions:

- 1 Les característiques electroactives del parell redox NADH/NAD^+ fan possible la detecció electroquímica d'aquest cofactor, si bé la irreversibilitat del sistema esdevé una limitació.
- 2 La dificultat que presenta el procés de reducció del NAD^+ sobre la superfície electròdica, porta a dissenyar els sistemes de detecció electroquímica del parell NADH/NAD^+ en base a l'oxidació de NADH , malgrat que aquest procés porta associat un sobrepotencial elevat que tendeix a reduir la selectivitat de les anàlisis.

- 3 El valor del potencial d'oxidació de NADH sobre platí, lleugerament inferior a l'obtingut de la caracterització electroquímica dels compòsits de grafit-epoxi, concorda amb el fet que el platí afavoreix la transferència electrònica amb les espècies en dissolució respecte els compòsits de grafit-epoxi.
- 4 L'avaluació del procés d'oxidació de NADH, quan s'empra un transductor de platí com a elèctrode de treball en un sistema de flux, dona lloc a un *enverinament* progressiu de la seva superfície.
- 5 L'estudi fonamentat en la comparació de voltamperogrames duts a terme en diferents condicions, quan s'utilitza un transductor de platí com a elèctrode de treball, permet concloure que es produeix una passivació de la superfície, si bé, la formació no controlada de complexos entre les espècies en dissolució i el platí dificulten el coneixement de quines són les espècies que provoquen l'enverinament de la superfície de l'elèctrode.
- 6 El desplaçament del potencial d'oxidació del NADH cap a valors més positius per a cicles consecutius duts a terme amb un compost de grafit-epoxi com a elèctrode de treball, corrobora la *passivació* de la seva superfície suggerida per la pèrdua de sensibilitat obtinguda quan es realitzen calibratges successius.
- 7 L'estudi de les adsorcions que tenen lloc sobre els compòsits de grafit-epoxi, presenta un alt grau de correlació amb el patró obtingut per a l'avaluació de les adsorcions sobre grafit vitrificat.
- 8 El procés d'oxidació de NADH sobre compòsits de grafit-epoxi, de la mateixa manera que sobre grafit vitrificat, es tracta d'un procés complex que té lloc en diverses etapes. L'estudi dels voltamperogrames obtinguts permet afirmar que aquest procés consta d'una primera etapa controlada per l'adsorció del NAD^+ sobre la superfície de l'elèctrode, i d'una segona etapa controlada per la difusió de les espècies electroactives en dissolució cap a la superfície del transductor.
- 9 L'adsorció de NAD^+ sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi s'accentua amb l'aplicació de potencials positius elevats, mentre que el NAD^+ adsorbit es desorbeix fàcilment a valors de potencial inferiors a 0 V.
- 10 Si bé l'adsorció del dímer és més forta que la de NAD^+ , aquesta es veu impedida mentre la superfície del compost de grafit-epoxi estigui saturada amb molècules de NAD^+ adsorbides.
- 11 El dímer només esdevé susceptible d'ésser oxidat quan es troba adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode.
- 12 Malgrat que els compòsits de grafit-epoxi esdevenen passivats progressivament, existeix un ampli recull bibliogràfic d'estudis adreçats a controlar i, fins i tot, a evitar (pretractament de superfícies) o resoldre (regeneració de superfícies passivades) aquest problema.

2.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ A. L. Underwood, R. W. Burnett. *Electroanalytical Chemistry*, **6** (1973) 13-55
- ² A. E. G. Cass. *Biosensors. A Practical Approach*. New York, Oxford University Press (1989) pp 82-83
- ³ C. O. Schmakel, K. S. V. Santhanam, P. J. Elving. *Journal of the American Chemical Society*, **97** (1975) 5083-5092
- ⁴ E. A. H. Hall. *Biosensors*, New Jersey, Prentice Hall (1991) p 126
- ⁵ L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ⁶ R. L. McCreery. *Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes*, ABI summerschool, Tuebingen (1996)
- ⁷ M. Jurckievitz. *Desarrollo de Bio(Analizadores) para la monitorización de Parámetros Bioquímicos (Amonio, Urea, Creatinina). Aplicación en Órganos Artificiales*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (1998) p 84-87
- ⁸ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) p 89
- ⁹ F. Céspedes. *Biosensor de Glucosa Basado en un Transductor Amperométrico Epoxy-Grafito*. Treball de recerca (Màster de Química). Universitat Autònoma de Barcelona (1991) 28-113
- ¹⁰ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, J. Bartrolí, S. Alegret. *Analytica Chimica Acta*, **273** (1993) 409-417
- ¹¹ A. Morales, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret. *Electrochimica Acta*, **43** (1998) 3575-3579
- ¹² M. Santandreu, F. Céspedes, S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 2080-2085
- ¹³ S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, M. del Valle. *Sensors and Materials*, **8** (1996) 147-153
- ¹⁴ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) p 80
- ¹⁵ J. Moiroux, P. J. Elving. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **102** (1979) 93-108
- ¹⁶ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) pp 106-109
- ¹⁷ H. D. Abruña. *Coordination Chemistry Reviews*, **86** (1988) 135-189
- ¹⁸ L. Gorton, E. Csöregi, E. Domínguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson. *Analytica Chimica Acta*, **250** (1991) 203-248

3 REGENERACIÓ DE LA SUPERFÍCIE PASSIVADA DEL TRANSDUCTOR UTILITZAT EN EL PROCÉS D'OXIDACIÓ DE NADH A NAD⁺

3.1 INTRODUCCIÓ

Els elèctrodes basats en composts de grafit-epoxi, de la mateixa manera que la resta d'elèctrodes de grafit, es caracteritzen per una àmplia aplicació en tècniques d'electroanàlisi, fet que esdevé afavorit en part pel seu baix cost i la seva versatilitat. Aquesta versatilitat pròpia dels elèctrodes de grafit és deguda a la facilitat que presenta aquest material per incorporar altres espècies químiques. No obstant això, el fet de posseir una química de superfície molt rica representa alhora la seva principal limitació. Si bé la reacció amb determinades espècies químiques obre un ventall molt important de possibles modificacions dirigides a millorar els processos electroquímics implicats en l'etapa de detecció, la relativa facilitat amb què es pot alterar la superfície de l'elèctrode fa molt difícil poder predir, avaluar i, sovint, reproduir les propietats finals d'un determinat elèctrode de grafit. Factors com la microestructura del grafit emprat, la netedat de la superfície electròdica o els grups funcionals exposats,¹ són vitals en la reactivitat electroquímica final que ha de presentar l'elèctrode. És per aquest motiu que la *història* del grafit emprat, donada pel seu origen, les seves propietats intrínseques i els pretractaments als quals ha estat sotmès, està estretament relacionada amb la resposta que presentarà l'elèctrode vers la detecció de diferents analits electroactius.

Per tot això, la necessitat d'una superfície apropiada i controlada dels elèctrodes a fi d'aconseguir mesures reproduïbles amb la màxima sensibilitat possible, implica sovint l'aplicació d'una etapa de pretractament. En la majoria de casos, aquest procés consisteix en l'aplicació alternada de potencials extrems d'oxidació i de reducció durant períodes de temps determinats.^{2,3} El seguiment d'aquest tipus de procediments assegura unes característiques inicials de superfície iguals per a tots els elèctrodes tractats de la mateixa manera. Ara bé, això no representa una solució als problemes de passivació que experimenten els elèctrodes durant l'oxidació continuada de NADH.

Atesa la importància de la detecció del NADH, per la seva implicació directa en les reaccions del subgrup d'enzims del tipus deshidrogenasa dependents de NAD⁺, i el fet que els problemes de passivació associats a la seva detecció electroquímica es troben descrits des de fa unes quantes dècades, no és d'estranyar l'existència d'un elevat nombre de publicacions relacionades amb diversos procediments dirigits a resoldre aquests problemes.

En un intent de classificar aquests tractaments, sembla lògic dividir-los en dos grups:

- 1 Tractaments dirigits a *prevenir l'adsorció* de les espècies que provoquen la passivació,
- 2 Tècniques de *regeneració*, per ésser aplicades un cop la superfície ja ha estat alterada amb l'adsorció d'espècies no desitjades.

Si bé es poden trobar publicacions que suggereixen l'ús de determinades tècniques electroanalítiques a fi de prevenir la passivació, com és el cas de l'article publicat per *Blaedel et al.*² on es proposa treballar amb la tècnica de voltamperometria d'estat estacionari enlloc d'usar la convencional, o l'addició a la solució de treball de certs tensoactius, com el *Triton*, o d'altres reactius, com el *tetraetilamoni* (E₄N⁺),⁴ adreçada a dificultar l'adsorció de determinades espècies sobre la superfície de l'elèctrode, l'opció més àmpliament emprada amb aquest objectiu es fonamenta en modificar químicament l'elèctrode, tal com es va parlar al Capítol 1. D'altra banda, *Aizawa et al.*⁵ plantegen l'adsorció del mateix NAD⁺ sobre la superfície de l'elèctrode com a via per impedir el procés d'acoblament intermolecular dels radicals (NAD[•]) i, per tant, la passivació de l'elèctrode. Per la seva banda, *Baik et al.*⁶ modifiquen amb *oleat de colesterol* un elèctrode basat en una amalgama d'or, fet que redueix notablement la passivació. De totes formes, la major part dels treballs dirigits a evitar la passivació de l'elèctrode durant el procés d'oxidació de NADH, es fonamenten en modificacions químiques. És molt important destacar el gran interès que en els darrers anys s'ha desenvolupat entorn l'estudi de la formació controlada de membranes estables i uniformes que han proporcionat interfases ben definides que disminueixen o eviten els problemes habituals de passivació de la superfície electròdica. Aquestes membranes s'han caracteritzat per la seva estabilitat estructural sota un ampli ventall de condicions biològiques (temperatura, pH, humitat,...), alhora que s'ha buscat que compleixin altres propietats com són cinètiques de difusió apropiades, una permeabilitat selectiva envers espècies interferents, així com propietats que les facin biocompatibles i que, per tant, puguin donar lloc a sensors implantables en sistemes vius⁷. Aquest és el cas proposat per *T. A. Desai et al.*⁸, que mostren unes membranes de silici amb nanoporus, que a més de reduir notablement la passivació per part d'espècies biològiques presents al medi de reacció, ofereixen una permeabilitat selectiva i una bona difusió de l'analit, en aquest cas, glucosa. Altres modificacions químiques es basen en dopar l'elèctrode amb catalitzadors,⁹ però sense dubte, les modificacions químiques amb mediadors d'oxidació-reducció,¹⁰ incorporats mitjançant metodologies variades al sistema de detecció, com es veurà al següent capítol, han estat les més comunament emprades, fins al punt que sovint una de les etapes fonamentals i indispensable en el desenvolupament d'un biosensor amperomètric passa per l'elecció del tipus de mediador redox, així com de la forma en què aquest s'incorpora al medi de reacció.

Ara bé, un cop la superfície de l'elèctrode ha quedat coberta de molècules adsorbides que provoquen una pèrdua de sensibilitat, només resta l'opció de cercar la forma de regenerar aquesta superfície. Les *tècniques de regeneració* habitualment emprades a fi d'eliminar de la superfície electròdica les espècies que s'han adsorbit, es poden incloure en algun dels següents apartats:

- ✓ Regeneració *química*,
- ✓ Regeneració *electroquímica*,
- ✓ Regeneració *física*.

La regeneració de la superfície passivada es pot dur a terme mitjançant un tractament químic basat en la immersió de l'elèctrode de treball en una solució d'àcid nítric concentrat, a fi d'oxidar les espècies adsorbides i provocar així la seva desorció.

Per altra banda, són nombrosos els tractaments de regeneració basats en processos electroquímics. Aquests cobreixen el rang que va des de tractaments considerats com a *suavis* fins a d'altres molt més *severs*, fent ús tant de corrent continu¹¹ com de corrent altern.¹² Aquests tractaments es poden combinar amb l'addició de certes espècies a la solució de treball, com per exemple àcid ascòrbic¹³, a fi d'augmentar la seva eficiència.

Una tercera estratègia per regenerar la superfície passivada es basa en un tractament físic que consisteix en un poliment d'aquesta. Aquest últim punt posa de manifest l'avantatge més important que ofereixen els compòsits de grafit-epoxi, basat en la possibilitat d'obtenir superfícies renovades, totalment reproduïbles, per a cada anàlisi mitjançant un simple poliment físic.

Finalment, cal esmentar l'existència d'altres mètodes adreçats a renovar i reactivar la superfície passivada dels elèctrodes, com són alguns procediments basats en l'ús de làsers,¹⁴ tractaments amb plasma o amb calor,...

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 APARELLS I REACTIUS

3.2.1.1 Aparells

Les mesures amperomètriques s'han dut a terme amb l'amperímetre descrit a § 2.2.1.1, mentre que per a les mesures d'intensitat amb l'aplicació d'un corrent altern, ADASA Sistemas S.A. va oferir un instrument que incorporava una targeta de condicionament (MULCON10). A aquest aparell se li va connectar un potenciòmetre MicropH 2002 de la casa Crison (Barcelona) a fi de poder llegir les mesures efectuades.

Els elèctrodes de referència i auxiliar emprats, així com els components del sistema de flux dissenyat, són els mateixos que els utilitzats en el capítol precedent.

3.2.1.2 Reactius

Els reactius usats en la construcció dels compòsits de grafit-epoxi són els mateixos que en el capítol anterior, a l'igual que el NADH. L'elèctrode de platí de configuració tubular es construeix a partir d'un fragment d'aproximadament 1 cm de longitud d'un tub de platí de 0.8 mm de diàmetre intern subministrat per la firma comercial Goodfellow.

Els reactius emprats per a la preparació de les capes denses de poliamida, 1,3-fenildiamina, 1,3,5-triclorur de tricarbonil benzè i hexà, són de la firma comercial Aldrich.

A fi de dur a terme el poliment físic dels composts de grafit-epoxi s'ha emprat paper de vidre de diferents números i paper d'alúmina de 3 µm (*polishing strips* 301044-001) adquirit a la casa Orion.

La resta de reactius emprats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

3.2.2 PREVENCIÓ DE LA PASSIVACIÓ

3.2.2.1 Viabilitat de treballar amb un amperímetre de corrent altern

Com ja s'ha dit, entre les metodologies de regeneració de la superfície d'un elèctrode passivat s'inclouen tractaments basats en l'aplicació alternada de potencials extrems d'oxidació i de reducció. Això porta a pensar en la possibilitat de poder treballar amb corrent altern com una forma de prevenir la passivació de la superfície, puix que l'aplicació d'un potencial de signe contrari al potencial de treball, durant un temps molt curt, podria evitar l'adsorció de productes intermedis sobre la superfície de l'elèctrode.

Per dur a terme aquests estudis, s'ha emprat un aparell dissenyat originàriament com a conductímetre de corrent altern. Aquest instrument porta incorporada una resistència variable que fa possible la regulació del potencial de treball a aplicar, que en aquest cas s'ha ajustat a 0.4 V. Els elèctrodes usats han estat un compost de grafit-epoxi i un elèctrode de referència de Ag/AgCl.

Atès que l'interval de valors de la resposta mesurada proporcionat per aquest aparell és limitat, els elevats resultats propis del NADH quedaven exclosos, fet que va portar a pensar en fer un estudi previ amb àcid ascòrbic, car aquesta espècie presenta un comportament electroquímic força semblant al NADH, essent sovint una interferència en la seva detecció.¹⁵

L'experiència ha consistit en la representació de corbes de calibració consecutives, obtingudes quan es fan addicions successives de microvolums de solucions de Fe(CN)₆⁴⁻ i d'àcid ascòrbic 0.01 M i de NaCl 4·10⁻² M, a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. L'estudi s'ha realitzat sense efectuar cap tractament de l'elèctrode de grafit entre mesures consecutives. El Fe²⁺ actua com a sistema model i l'àcid ascòrbic com a substituent del NADH. Les addicions de NaCl s'han fet a fi de comprovar que la força iònica no representa un factor interferent a les mesures realitzades.

3.2.2.2 Aplicació de monocapes denses de poliamida

L'eficiència de l'ús de capes polimèriques formades per polimerització interfacial en l'estabilització de membranes líquides suportades¹⁶, va suggerir la possibilitat d'emprar la poliamida com a recobrim

permselectiu dels elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi.^{17,18,19} L'objectiu plantejat va ser excloure de la superfície electròdica espècies interferents no desitjades, com tensoactius o subproductes de la reacció que té lloc, que es poden adsorbir o acumular sobre la superfície de l'elèctrode que, com a conseqüència, esdevindrà passivada. De fet, el recobriment dels elèctrodes de treball amb membranes polimèriques permselectives resulta ésser un procediment habitual per evitar l'adsorció de diferents espècies sobre la seva superfície.^{20,21,22} Per tant, s'ha volgut estudiar en quin grau les capes denses de poliamida minimitzen l'enverinament i posterior passivació de la superfície electròdica, fet que es reflectirà en una major estabilitat de l'elèctrode, que alhora anirà acompanyada d'un cert grau de selectivitat envers determinades espècies pel fet de separar la superfície electròdica del medi de reacció mitjançant aquestes membranes.

El procediment emprat per a la formació de les capes denses de poliamida sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi ha estat la polimerització interfacial, basada en dues etapes consecutives. En primer lloc es duu a terme la immersió de la superfície del compòsit en una solució de 1,3-fenildiamina de concentració 2.8 mM, i tot seguit, un cop s'ha eliminat l'excés de diamina, s'addicionen un parell de gotes d'una solució de 1,3,5-triclorur de tricarbonil benzè 5.1 mM en hexà, amb l'objectiu d'iniciar la reacció de polimerització per tal que es formi una capa prima de polímer. Finalment, l'elèctrode es renta amb aigua bidestil·lada en abundància a fi de poder eliminar els reactius que no han polimeritzat. Les capes de poliamida formades mostren molt poc gruix, car la reacció entre el clorur d'àcid addicionat i la diamida adherida sobre la superfície electròdica es va impeding progressivament degut a la barrera difusional que representa la pròpia membrana.

Per a avaluar el caràcter de protecció vers la passivació que ofereixen les capes denses de poliamida, s'han representat corbes de calibració consecutives, així com periòdicament quasi durant tres mesos, obtingudes quan es fan addicions successives de microvolums de solucions de NADH 0.01 M, a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. L'estudi s'ha realitzat sense efectuar cap tractament de l'elèctrode de grafit entre mesures.

3.2.2.3 Electrocatàlisi

Atès que s'ha realitzat un estudi extens de sistemes adreçats a prevenir la passivació mitjançant processos d'electrocatalisi, s'ha cregut convenient dedicar els tres capítols següents a descriure'ls. Així, els Capítols 4 i 5 recullen el treball sistemàtic dut a terme amb l'ús de mediadors d'oxidació-reducció, i el Capítol 6 descriu el treball desenvolupat amb elèctrodes preparats amb gels de sílice modificats amb metalls.

3.2.3 REGENERACIÓ DE SUPERFÍCIES PASSIVADES

3.2.3.1 Regeneració mecànica basada en el poliment físic dels transductors de grafit-epoxi

Amb l'objectiu de poder veure l'efecte que causa el poliment físic de la superfície del compost de grafit-epoxi, es representen dues corbes de calibració successives obtingudes en un sistema de mesura amperomètric convencional. La primera corba correspon a les mesures d'intensitat de corrent per a l'oxidació de NADH quan s'empra, com a elèctrode de treball, un compost prèviament utilitzat en diverses ocasions i, per tant, amb la seva superfície passivada. La segona és el resultat de les mateixes mesures, per bé que ara s'usa el mateix elèctrode però després d'haver-li aplicat un poliment físic.

A fi d'obtenir les mesures d'intensitat desitjades s'aplica un potencial de 0.8 V a una cel·la electroquímica que conté un volum de 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5, en agitació constant, on està submergit el compost de grafit, que actua com a elèctrode de treball, i els elèctrodes auxiliar i de referència. Un cop s'assoleix l'estabilització del sistema, es fan addicions de microvolums d'una solució de NADH 0.01 M. Després es poleix la superfície del compost, inicialment amb paper de vidre fi i, finalment, s'humiteja amb unes gotes d'aigua bidestil·lada i s'acaba de polir amb paper d'alúmina de 3 µm. Aleshores es torna a repetir la mateixa calibració, en les mateixes condicions.

3.2.3.2 Regeneració electroquímica de la superfície dels transductors de platí

Com ja s'ha esmentat prèviament, la regeneració electroquímica ofereix un ampli ventall de possibilitats, de manera que en aquest apartat s'avaluaran alguns tractaments electroquímics que van des de la simple aplicació de potencials extrems, fins a un estudi de l'efecte que resulta de provocar un curtcircuit entre l'elèctrode de treball i l'auxiliar.

3.2.3.2.1 Aplicació de potencials extrems d'oxidació i/o reducció

Per poder avaluar l'efecte de l'aplicació de potencials extrems d'oxidació i de reducció sobre la superfície passivada d'un transductor de platí de configuració tubular, s'ha dissenyat un sistema de flux monocanal com l'emprat a § 2.2.2.3, només que ara l'elèctrode indicador de platí és de configuració tubular enloc de plana. El potencial extrem d'oxidació escollit ha estat 1.2 V, ja que a aquest potencial se suposa que totes les espècies adsorbides susceptibles d'ésser oxidades ja hauran reaccionat. D'altra banda, atès que per sota de 0 V ja té lloc la desorció del NAD⁺ adsorbit (vegeu § 2.3.2.3), s'ha considerat suficient l'aplicació de -0.825 V a fi de provocar la desorció de totes les espècies adsorbides que poden captar electrons i, per tant, reduir-se per donar espècies que ara restaran en dissolució.

S'han fet injeccions successives de NADH 5·10⁻⁵ M, sobre una solució portadora desairejada de tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1 M a pH 7.5, i un cop demostrada la passivació de la superfície, atesa la disminució continuada dels pics d'intensitat mesurats per injeccions de la mateixa concentració de

NADH, s'ha aplicat un potencial de 1.2 V durant 30 s i després, durant 30 s més, s'ha mantingut el potencial de treball a -0.825 V. S'ha repetit la mateixa experiència per injeccions de NADH 10^{-5} M.

Finalment, s'ha fet el mateix injectant NADH 10^{-4} M i, per últim, NADH 10^{-3} M. Si bé en aquests dos darrers casos, l'aplicació dels potencials extrems, durant 30 s cada un, s'ha efectuat successivament entre injecció i injecció.

Per a aquestes experiències s'han calculat percentatges de recuperació, segons l'expressió matemàtica següent:

$$\text{percentatge de recuperació (\%)} = \frac{\text{senyal inicial} - \text{senyal recuperat}}{\text{senyal inicial}} \times 100$$

Atès que a la bibliografia també es recullen diverses estratègies fonamentades en l'aplicació d'un únic potencial extrem de condicionament, s'ha avaluat mitjançant injeccions successives de NADH $5 \cdot 10^{-5}$ M l'efecte que provoca l'aplicació d'un potencial d'oxidació de 1.6 V²³ durant 6 minuts i durant 30 s. S'ha repetit l'experiència però amb l'aplicació d'un potencial de reducció extrem de -0.25 V durant 30 s.

El volum d'injecció, la velocitat de bomba i el potencial de treball aplicat són els mateixos que els fixats a § 2.2.2.3.

3.2.3.2.2 *Curtcircuit entre els elèctrodes de treball i auxiliar*

Atès que la passivació és deguda a l'adsorció d'espècies sobre la superfície de l'elèctrode, on es genera una doble capa elèctrica, l'alteració d'aquesta bicapa elèctrica podrà influir en el procés d'adsorció. Per aquest motiu, una de les estratègies de regeneració s'ha basat en intentar modificar la doble capa (actua com a condensador) mitjançant l'alteració de les càrregues elèctriques que hi ha al seu interior, fet que pot afectar a les interaccions electrostàtiques de la superfície electròdica amb les espècies electroactives. Amb aquest objectiu s'ha estudiat l'efecte que s'obté com a resultat de provocar un curtcircuit entre els elèctrodes de treball i l'auxiliar a fi d'obtenir dobles capes més reproduïbles amb un menor temps d'estabilització.

S'ha treballat fent injeccions successives de NADH 10^{-5} M al sistema de flux monocanal descrit a l'apartat precedent, amb les mateixes condicions. Inicialment, no s'ha aplicat cap tractament entre mesures consecutives. A una segona fase, s'ha realitzat un cicle de potencial entre 1.6 V i -1.1 V, potencials que s'han mantingut durant 30 s cada un, i a continuació s'han curtcircuitat els elèctrodes de treball i l'auxiliar a través d'una resistència de 10 K Ω situada en paral·lel respecte l'amperímetre. Per últim, s'ha realitzat el curtcircuit únicament entre injeccions successives.

Finalment, s'ha obtingut una corba de calibració on cada punt correspon a la mitjana de 5 injeccions consecutives d'una solució de NADH d'una concentració determinada. En aquest cas el curtcircuit

s'aplica únicament quan es passa d'una concentració de NADH a la següent. L'interval de concentracions de les solucions de NADH va de 10^{-6} M fins a $8 \cdot 10^{-5}$ M, i la solució portadora és una solució de NADH $1 \cdot 10^{-4}$ M. Aquesta darrera experiència s'ha dut a terme mitjançant injeccions de solucions de NADH de concentracions inferiors a la de la solució portadora, puix que l'aplicació final d'aquests estudis ha d'ésser un sistema de flux en què es mesuraran disminucions de la concentració de NADH, com a resultat de la reacció d'aquesta espècie amb l'ió amoni.

3.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.3.1 PREVENCIÓ DE LA PASSIVACIÓ

3.3.1.1 Viabilitat de treballar amb un amperímetre de corrent altern

Atesa la possibilitat de treballar amb l'aplicació d'un corrent altern a fi d'evitar la passivació de la superfície dels elèctrodes, com a pas previ s'ha procedit a comprovar el bon funcionament de l'amperímetre de corrent altern mitjançant mesures d'un sistema considerat com a model: una solució de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. A la Figura 3.1(A) estan representades les corbes de calibració successives obtingudes com a resultat de fer addicions de microvolums de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 0.01 M a 10 ml de tampó fosfat. Si bé el sistema presenta una bona resposta a Fe^{2+} , la possibilitat que part de la resposta fos conseqüència de petits canvis de força iònica va portar a repetir el mateix estudi però ara amb addicions de microvolums de NaCl $4 \cdot 10^{-2}$ M, amb l'objectiu d'aportar un nombre elevat d'ions a la solució capaç d'afectar a la força iònica total. En base als resultats mostrats a la Figura 3.1(A), es pot deduir que les mesures no són degudes a canvis de la força iònica, sinó a la reacció electroquímica de l'espècie electroactiva.

Per últim, a la Figura 3.1(B) hi ha representades les corbes de calibració successives obtingudes per a l'àcid ascòrbic, utilitzat com a substituent del NADH. S'observa una bona resposta per a l'oxidació d'aquesta espècie, tot i que hi ha una certa dispersió dels resultats que caldria disminuir. Aquests resultats deixen una porta oberta adreçada a avaluar amb aquest aparell la passivació de l'elèctrode quan es treballa amb NADH, un cop s'hagi adaptat l'interval de valors del senyal de sortida a l'obtingut per a addicions d'aquesta espècie.

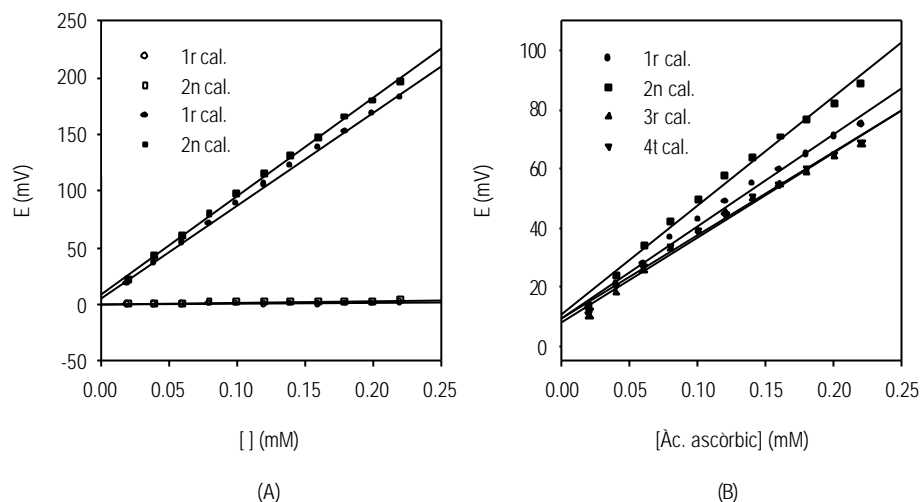


Figura 3.1: Corbes de calibració successives (A) per NaCl (símbols blancs) i $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (símbols negres) i (B) per àcid ascòrbic. En tots els casos les mesures s'han dut a terme en un sistema discret amb un amperímetre de corrent altern. L'elèctrode de treball és un transductor basat en un compost de grafit-epoxi.

3.3.1.2 Aplicació de monocapes denses de poliamida

A la Figura 3.2 (A) queda palesa l'eficiència de les capes denses de poliamida com a recobriments de protecció vers possibles adsorcions d'espècies implicades en l'oxidació del cofactor NADH sobre la superfície electròdica, que portarien a la passivació de la mateixa. Aquest tipus de membrana polimèrica permet determinar NADH de forma molt reproducible (RSD= 0.5 %, n= 3), amb una sensibilitat de $4397 \mu\text{A}/\text{M}$, quan s'aplica un potencial de treball de 0.65 V. A aquest bon comportament cal afegir un paràmetre addicional com és l'estabilitat d'aquestes capes de poliamida amb el temps. La Figura 3.2 (B) mostra la sensibilitat a NADH avaluada en un període de temps de 80 dies, durant els quals l'elèctrode de treball s'ha conservat sec a temperatura ambient. S'observa com aquest paràmetre no esdevé afectat durant tot aquest temps, fet que confirma la utilitat de les capes de poliamida com a modificacions físiques dirigides a minimitzar els problemes de passivació típics dels sensors amb detecció amperomètrica. D'altra banda, cal destacar que si bé la poliamida minimitza un greu problema molt habitual com és la pèrdua de sensibilitat per passivació, el fet que no s'incorpori cap espècie que afavoreixi la cinètica de transferència electrònica lenta típica d'aquests dispositius, com per exemple un mediador d'oxidació-reducció, obliga a treballar emprant les mateixes condicions que quan es treballa amb un elèctrode normal. Això implica alguns inconvenients, com per exemple l'aplicació d'un elevat potencial de treball que afectarà negativament a la selectivitat del sensor emprat.

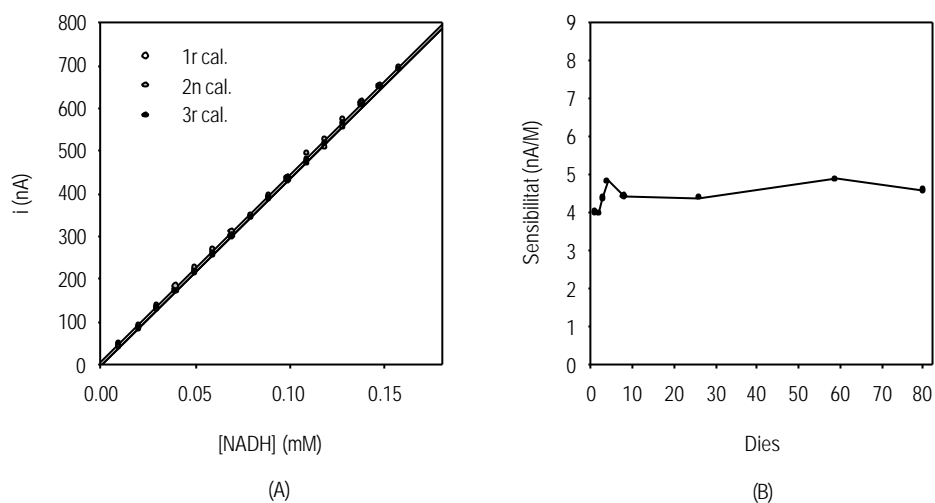


Figura 3.2: (A) Corbes de calibració consecutives per a la determinació de NADH i (B) variació de la sensibilitat obtinguda amb aquestes corbes al llarg del temps. L'elèctrode de treball és un transductor basat en un compost de grafit-epoxi cobert per una capa densa de poliamida preparada amb 1,3-fenildiamina. El potencial de treball aplicat ha estat 0.65 V.

3.3.2 REGENERACIÓ DE SUPERFÍCIES PASSIVADES

3.3.2.1 Regeneració mecànica basada en el poliment físic dels transductors de grafit-epoxi

La Figura 3.3 mostra un augment del senyal que s'obté com a resultat de la regeneració de la superfície passivada dels composts de grafit-epoxi duta a terme mitjançant el seu poliment. Malgrat que queda palesa l'eficiència d'aquest tractament, el nivell de practicitat associat resulta ésser força baix, i encara més quan l'objectiu final és l'aplicació a un sistema de flux continu, on el poliment de la superfície de l'elèctrode de treball implicaria un consum de temps elevat i una manipulació del sistema que limitaria la seva reproductibilitat.

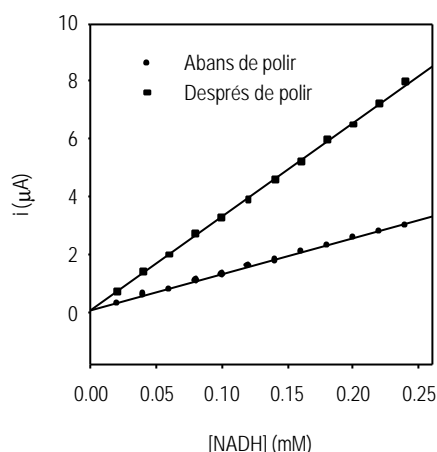


Figura 3.3: Corbes de calibració per a NADH, obtingudes en un sistema discret, abans i després d'aplicar un poliment físic a la superfície del compost de grafit-epoxi emprat com a elèctrode de treball. El potencial aplicat ha estat 0.8 V.

3.3.2.2 Regeneració electroquímica de la superfície dels transductors de platí

La pèrdua continuada de senyal observada, no solament com a resultat d'efectuar mesures consecutives de l'oxidació de NADH, sinó també deguda a la circulació de solució amortidora, per l'aplicació del potencial associat al procés d'oxidació del NADH, va evidenciar la importància que tenen els tractaments electroquímics, aplicats a l'elèctrode, en els processos que alteren la seva superfície.

3.3.2.2.1 Aplicació de potencials extrems d'oxidació i/o reducció

Dels resultats mostrats a la Taula 3.1 que corresponen als percentatges de recuperació de senyal assolits amb l'aplicació d'un cicle de potencial entre 1.2 V i -0.825 V, mantinguts ambdós potencials durant 30 s cadascun, es pot deduir que aquesta estratègia no aconsegueix evitar totalment la passivació de l'elèctrode, per bé que permet reactivar la superfície parcialment. És a dir, s'observa que després de 10 mesures, quan la pèrdua de senyal ja és considerable, l'aplicació de potencials extrems permet regenerar gairebé totalment la superfície de l'elèctrode (dues primeres files). Ara bé, si s'apliquen aquests potencials extrems entre mesures consecutives, a fi de poder obtenir una bona repetitivitat entre mesures successives, es fa palesa una pèrdua continuada de senyal (dues últimes files) que indica una regeneració deficient de la superfície electròdica. La Figura 3.4, basada en la repetitivitat d'injeccions de NADH amb l'aplicació d'un cicle de potencial com a etapa prèvia a cada mesura, confirma aquest fet.

Taula 3.1: Percentatge de recuperació del senyal obtingut com a resultat de l'aplicació d'un cicle de potencial entre 1.2 V i -0.825 V, després de 10 injeccions (1a part), o entre injecció i injecció (2a part) de solucions de NADH de concentració coneguda en un sistema de flux. En aquest últim cas, el percentatge correspon a la mitjana de (*) 3 i de (**) 5 valors. Els límits de confiança inclosos s'han calculat com a $\pm (t \cdot s)/\sqrt{n}$, on s'ha emprat un valor de t corresponent a un nivell de confiança del 95%, s és la desviació estàndard associada i n el número de valors emprats en el càlcul de la mitjana. L'elèctrode de treball emprat ha estat un elèctrode tubular de platí. El potencial aplicat ha estat 0.825 V.

| [NADH] (M) | PERCENTATGE DE RECUPERACIÓ (%) |
|-------------------|--------------------------------|
| $1 \cdot 10^{-5}$ | 99 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 99 |
| $1 \cdot 10^{-4}$ | $91 \pm 19^*$ |
| $1 \cdot 10^{-3}$ | $94 \pm 2^{**}$ |

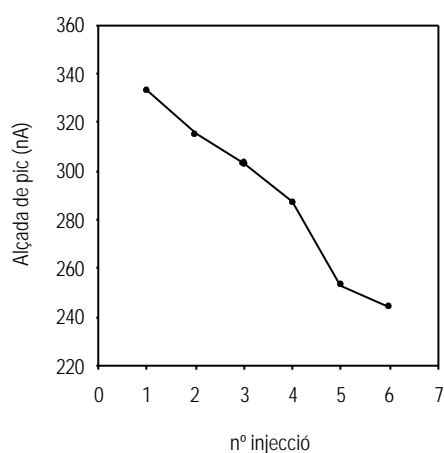


Figura 3.4: Disminució del senyal obtingut per a injeccions consecutives d'una solució de NADH $1 \cdot 10^{-3}$ M en un sistema de flux quan s'aplica una etapa de reactivació que consisteix en un cicle de potencial entre injeccions. L'elèctrode de treball és un elèctrode tubular de platí. El volum d'injecció ha estat de 200 μ l i el potencial de treball aplicat ha sigut 0.825 V.

Per altra banda, l'aplicació d'un potencial extrem de condicionament tampoc sembla ésser la solució al problema de passivació de la superfície, ja que si bé l'aplicació d'un potencial extrem de reducció permet la recuperació de part del senyal, de la mateixa manera que l'aplicació de 1.6 V durant 6 minuts i a diferència de l'aplicació d'aquest mateix potencial extrem d'oxidació durant un període de temps més

curt, la manca de reproductibilitat dels resultats obtinguts implica que aquesta tècnica no pugui ésser usada com a una bona metodologia de regeneració *in situ*.

3.3.2.2 Curtcircuit entre els elèctrodes de treball i auxiliar

A partir dels resultats experimentals representats a la Figura 3.5, es podria pensar que la passivació de la superfície de l'elèctrode té alguna relació amb la doble capa elèctrica, atès que l'aplicació d'un curtcircuit entre l'elèctrode de treball i l'auxiliar, mitjançant una resistència col·locada en paral·lel respecte a l'amperímetre, sembla modificar les característiques adsorptives de la superfície de l'elèctrode, com a resultat de l'alteració d'aquesta doble capa.

No obstant això, els resultats obtinguts de l'aplicació d'un curtcircuit per a la regeneració de superfícies passivades, no s'han considerat del tot satisfactoris malgrat la repetitivitat observada, ja que s'han detectat, sense causa aparent, diferències entre mesures de processos idèntics. Aquest fet pot ser degut a que resulta difícil dur a terme un control adequat de les condicions en què es realitza el curtcircuit.

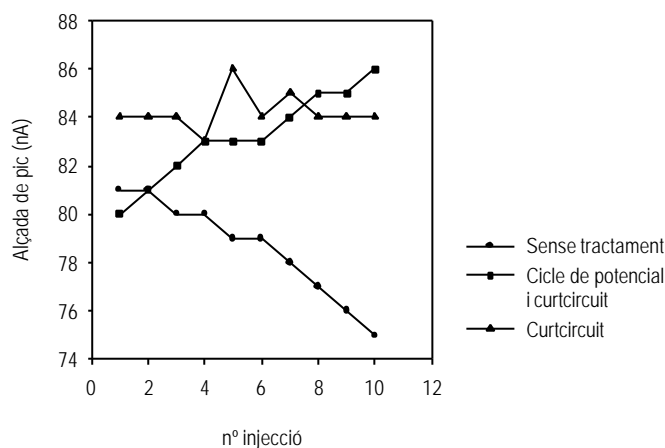


Figura 3.5: Avaluació de la variació del senyal obtingut quan s'injecta consecutivament volums de $200 \mu\text{l}$ d'una solució de $\text{NADH } 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en un sistema de flux, on l'elèctrode de treball és un elèctrode tubular de platí. El cicle de potencial ha consistit en mantenir el potencial durant 30 s a 1.6 V i després durant 30 s més a -1.1 V . El curtcircuit entre els elèctrodes de treball i auxiliar s'ha dut a terme a través d'una resistència de $10 \text{ K}\Omega$, situada en paral·lel respecte a l'amperímetre. Ambdós tractaments s'han efectuat entre injecció i injecció. S'ha aplicat un potencial de treball de 0.825 V .

A la Figura 3.6 es mostra la corba de calibració obtinguda per a solucions de NADH de diferents concentracions, curtcircuitant quan es passa d'una concentració a la següent. Cada punt ve donat per

la mitjana de 5 injeccions successives d'una solució de NADH d'una concentració determinada, essent en tots els casos el percentatge de dispersió inferior a l'1.2 %.

Cal destacar com un fet important la disminució del temps d'estabilització que s'obté com a resultat de l'aplicació d'un curtcircuit previ a les mesures, entès com un pretractament adreçat a afavorir l'estabilització de la doble capa elèctrica que es genera a la interfase elèctrode-solució.

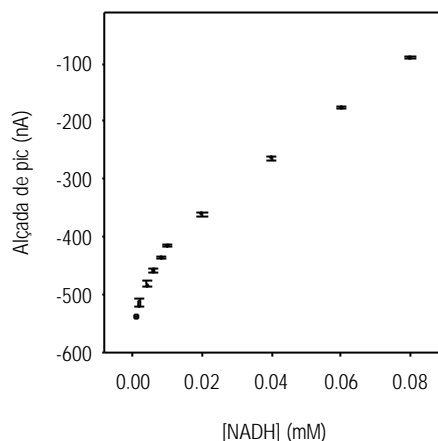


Figura 3.6: Corba de calibració per a NADH obtinguda en un sistema de flux. Les barres verticals mostren el valor de la desviació estàndard obtingut per a 5 injeccions consecutives d'una mateixa concentració. L'alçada de pic ve donada per la diferència entre el valor obtingut per la solució portadora (solució de NADH $1 \cdot 10^{-4}$ M en tampó fosfat 0.1 M i KCl 0.1M a pH 7.5) i el corresponent a la solució que s'està injectant. L'elèctrode de treball és un elèctrode tubular de platí. El volum d'injecció és de 200 μ l. El potencial de treball és 0.825 V.

3.4 CONCLUSIONS

Les conclusions extretes del present capítol han estat:

- 1 Les característiques superficials dels elèctrodes, responsables del seu comportament, varien àmpliament en funció de l'origen i dels pretractaments als quals s'han sotmès. De la mateixa manera, la seva sensibilitat vers un sistema redox determinat, depèn d'aquestes característiques i de la història de l'elèctrode.
- 2 A fi d'aconseguir mesures reproduïbles, en alguns casos cal realitzar una etapa de pretractament basada en l'aplicació alternada de potencials extrems que permet un major control de les característiques de la superfície dels elèctrodes.

- 3 Els procediments de neteja i/o regeneració de la superfície de l'elèctrode alteren les característiques d'aquesta, fet que afecta a la reproductibilitat de les mesures.
- 4 La possibilitat de treballar amb un amperímetre de corrent altern, atesos els bons resultats obtinguts per a la determinació d'àcid ascòrbic, representa una porta oberta cap a metodologies adreçades a prevenir la passivació en base a la dificultat que tenen certes espècies per adsorbir-se sobre les superfícies que canvien de polaritat amb una alta freqüència.
- 5 Les capes denses de poliamida emprades com a membrana de recobriment de la superfície dels elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi, minimitzen els problemes de passivació de la superfície electròdica implícits en la detecció amperomètrica del cofactor NADH. Aquesta absència de passivació es manté durant un període de temps de més de dos mesos i mig, durant el qual els elèctrodes s'han avaluat periòdicament i s'han conservat secs a temperatura ambient entre calibracions. La limitació més important de l'ús dels recobriments de poliamida sorgeix de l'elevat potencial típic que cal aplicar per a la determinació de NADH sobre una superfície de carboni, que sense mediadors redox no es pot disminuir, fet que afectarà a la selectivitat mostrada per aquests elèctrodes.
- 6 Si bé la regeneració física basada en el poliment de la superfície dels compòsits de grafit-epoxi resulta ésser un mètode efectiu dirigit a obtenir superfícies reproduïbles, esdevé poc pràctica, atès que requereix diverses etapes de manipulació de la cel·la electroquímica que dificulten el procés d'automatització.
- 8 La regeneració electroquímica que consisteix en l'aplicació d'un cicle de potencial, tot i que comporta una reactivació parcial de la superfície, no aconsegueix regenerar totalment la superfície de l'elèctrode.
- 9 Els assaigs duts a terme per reactivar electroquímicament la superfície passivada, basats en l'aplicació d'un potencial constant de condicionament, mostren una clara dependència del valor de potencial i del temps d'aplicació, fet que suggereix un difícil control de les condicions que alteren i modifiquen les característiques electroquímiques de la superfície de l'elèctrode.
- 10 L'eficàcia de la inducció d'un curtcircuit entre l'elèctrode de treball i l'auxiliar a l'hora de regenerar la superfície passivada de l'elèctrode porta a pensar en la influència de la doble capa elèctrica sobre la capacitat adsortiva d'aquesta superfície.
- 11 El curtcircuit provocat entre els elèctrodes, mitjançant una resistència col·locada en paral·lel a l'amperímetre, altera la doble capa elèctrica i, per tant, les característiques adsortives de la superfície, donant dobles capes més reproduïbles, i redueix el temps d'estabilització del sistema.

3.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ R. L. McCreery. *Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes*. Tuebingen, ABI summerschool (1996)
- ² W. J. Blaedel, R. A. Jenkins. *Analytical Chemistry*, **46** (1974) 1952-1955
- ³ J. Moiroux, P. J. Elving. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **102** (1979) 93-108
- ⁴ C. O. Schmamel, K. S. V. Santhanam, P. J. Elving. *Journal of the American Chemical Society*, **97** (1975) 5083-5092
- ⁵ M. Aizawa, R. W. Coughlin, M. Charles. *Biotechnology and Bioengineering*, **18** (1976) 209-215
- ⁶ S. H. Baik, C. Kang, H. C. Jeon, S. E. Yun. *Biotechnology Techniques*, **13** (1999) 1-5
- ⁷ R. F. Turner, D. J. Harrison, R. V. Rajotte. *Biomaterials*, **12** (1991) 361-368
- ⁸ T. A. Desai, D. J. Hansford, L. Leoni, M. Essenpreis, M. Ferrari. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 453-462
- ⁹ T. N. Rao, I. Yagi, T. Miwa, D. A. Tryk, A. Fujishima. *Analytical Chemistry*, **71** (1999) 2506-2511
- ¹⁰ S. A. Wring, J.P.Hart. *Analyst*, **117** (1992) 1215-1229
- ¹¹ C. Gyss, C. Bourdillon. *Analytical Chemistry*, **59** (1987) 2350-2355
- ¹² J. Wang, M. S. Lin. *Analytical Chemistry*, **60** (1988) 499-502
- ¹³ W. B. Nowall, W. G. Kuhr. *Analytical Chemistry*, **67** (1995) 3583-3588
- ¹⁴ M. Poon, R. L. McCreery. *Analytical Chemistry*, **58** (1996) 2745-2750
- ¹⁵ J. Kulyš, G. Gleixner, W. Schuhmann, H-L. Schmidt. *Electroanalysis*, **5** (1993) 201-207
- ¹⁶ A. J. B. Kemperman, H. H. M. Rolevink, D. Bargeman, Th. Van den Boomgaard, H. Strathmann. *Journal of Membrane Science*, **138** (1998) 43-55
- ¹⁷ M. Mulder. *Basic Principles of Membrane Technology*. Netherlands, Kluwer Academic (1996)
- ¹⁸ W. S. W. Ho, K. K. Sirkar (Eds.). *Membrane Handbook*. New York, Van Nostrand Reinhold (1992)
- ¹⁹ H. Tsutsumi, K. Fujita. *Electrochimica Acta*, **40** (1995) 879-882
- ²⁰ J. Wang. *Electroanalysis*, **3** (1991) 255-259
- ²¹ O. Chastel, J. Kaufman, G. Patriarce, G. Christian. *Analytical Chemistry*, **61** (1989) 170-173
- ²² R. W. Murray, A. G. Ewing, R. A. Durst. *Analytical Chemistry*, **59** (1987) 379A-390A
- ²³ S. Solé. *Desenvolupament de sistemes biosensors enzimàtics i immunològics basats en un suport magnètic renovable*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (2000) p 204

4 DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH: ESTUDI COMPARATIU DE DIFERENTS METODOLOGIES D'INCORPORACIÓ DE DIVERSOS MEDIADORS REDOX AL SISTEMA DE DETECCIÓ

4.1 INTRODUCCIÓ

Les modificacions químiques de la superfície electròdica són una via que permet controlar les propietats de la interfase elèctrode-solució, adreçada a resoldre problemes com la passivació gradual de la superfície de l'elèctrode, a més de millorar la cinètica de transferència electrònica i/o la selectivitat vers l'analit.¹ Durant dècades s'han proposat nombrosos materials nous i diverses modificacions químiques dels elèctrodes, amb la intenció de superar aquestes limitacions. *Blaedel* i *Jenkins*² van mostrar a la dècada dels 70, que un tractament electroquímic adequat d'un elèctrode de grafit pot portar a disminuir significativament el sobrepotencial necessari. Aquesta propietat s'atribueix a la formació sobre la superfície de grafit de grups amb oxigen com *hidroxils*, *carbonils*, *carboxils* o *estructures quinoidals*, que acaben actuant com a molècules mediadores. Des d'aquell moment la recerca s'ha centrat al voltant del desenvolupament i estudi de molècules mediadores encarregades de mediatitzar la transferència electrònica entre l'elèctrode i el centre redox dels enzims. Així, durant anys, s'han publicat molts articles on es fa referència a modificacions químiques basades en la incorporació de mediadors d'oxidació-reducció o altres molècules amb propietats catalítiques, adreçades a obtenir transferències electròniques heterogènies afavorides entre la superfície electròdica i les espècies electroactives a detectar. En aquest sentit, la modificació química de la superfície dels elèctrodes ha estat una tècnica àmpliament emprada com a una metodologia útil adreçada a prevenir l'adsorció de determinades molècules orgàniques d'elevat pes molecular, presents a la solució, o de certs subproductes de la reacció, que poden enverinar la superfície de l'elèctrode.³ És per aquest motiu que com a continuació dels experiments inicials detallats al capítol anterior, s'ha decidit dur a terme un estudi en més profunditat sobre modificacions químiques dels compòsits de grafit-epoxi a fi de resoldre els problemes de passivació.

Com ja es va veure al Capítol 2, la passivació de la superfície dels transductors utilitzats per a la determinació de NADH es veu agreujada amb l'aplicació de potencials elevats que afavoreixen l'adsorció de les molècules de NAD⁺.⁴ És per aquest motiu que l'electrocatalisi es planteja com a una possible solució a la pèrdua de senyal causada per l'enverinament de la superfície, atès que minimitza el sobrepotencial requerit, mitjançant una reacció mediatitzada que afavoreix la transferència electrònica, fet que alhora representa una millora de la selectivitat, puix que es redueix el número d'interferències susceptibles d'ésser oxidades al nou potencial de treball.

Si bé l'electrocatalisi es pot dur a terme amb la incorporació al mecanisme de reacció de catalitzadors metàl·lics o de mediadors redox, on s'inclouen també certes proteïnes amb propietats redox, s'ha

escollit treballar amb aquests últims, atesa la versatilitat que posseeixen a l'hora d'ésser implementats als procediments d'anàlisi.

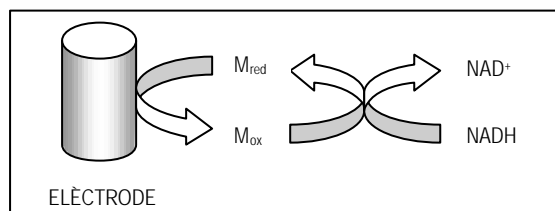


Figura 4.1: Esquema de l'oxidació de NADH mitjançant un procés d'electrocatalàlisi en què intervé un mediador redox.

S'han seleccionat set mediadors d'oxidació-reducció dirigits a cobrir, el més àmpliament possible, el ventall de propietats que inclou la classificació de mediadors⁵ presentada a § 1.3.1.3.

El *ferricianur* ($Fe(CN)_6^{3-}$) és l'únic mediador inorgànic amb què s'ha treballat, ja que la naturalesa d'aquest tipus de mediadors limita les estratègies possibles d'incorporació al quimiosensor, a través d'un procés d'immobilització.

D'entre els mediadors orgànics escollits, la sal conductora *tetratiafulvalè-tetracianoquinodimetà* (TTF-TCNQ), habitualment emprada com a material per a la preparació d'elèctrodes, només s'ha avaluat incorporada a la matriu rígida polimèrica dels elèctrodes de grafit-epoxi. La resta de mediadors orgànics, malgrat posseir pesos moleculars baixos, presenten més possibilitats a l'hora d'ésser immobilitzats, ateses les propietats associades al seu caràcter orgànic. Per aquest motiu, els altres cinc mediadors orgànics que s'han emprat són:

- *Meldola Blue* o *7-dimetilamino-1,2-benzofenoxazina* (MB), del tipus *fenoxazina*,
- *p-benzoquinona* (*p-BQ*), del tipus *quinona-hidroquinona*,
- *2,6-diclorofenolindofenol* (DCPIP), el radical fenòlic del qual intervé perdent un electró per formar un radical catiònic estable durant el procés d'oxidació,
- *o-fenilendiamina* (*o-PDA*),
- *3,4-dihidroxibenzaldehyd* (*3,4-DHB*).

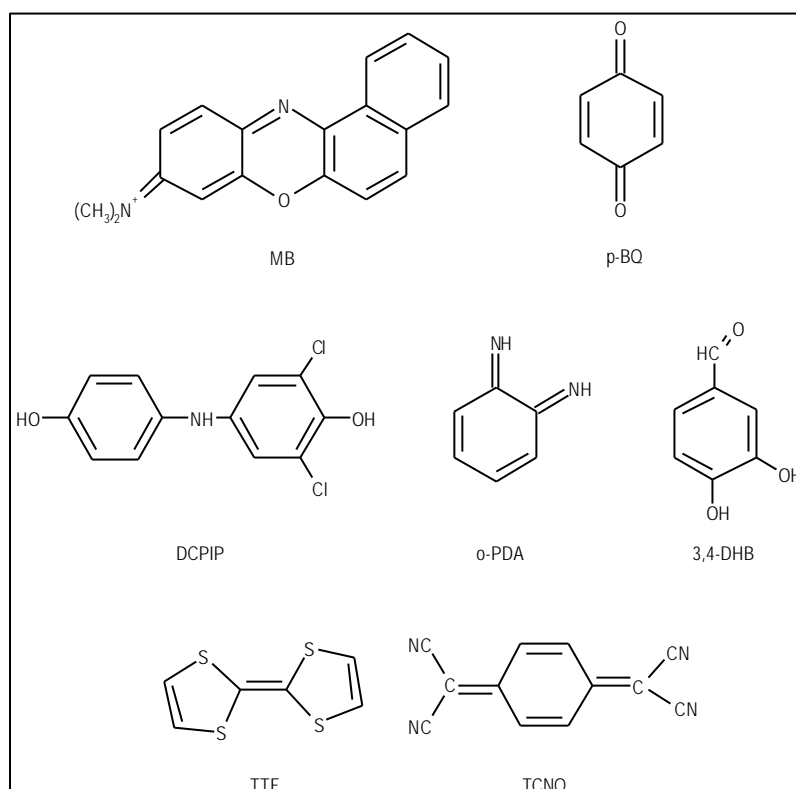


Figura 4.2: Fórmules estructurals dels mediadors orgànics estudiats.

Atès que l'estratègia d'incorporació del mediador a la configuració d'un quimiosensor incideix notablement en el seu comportament,⁶ s'ha dut a terme un estudi comparatiu de diferents quimiosensors que incorporen el mediador:

- ✓ en solució,^{7,8,9}
- ✓ incorporat a l'interior del compost,^{10,11,12,13,14}
- ✓ adsorbit,^{9,15,16}
- ✓ adsorbit en membranes de Nafió,^{17,18,19,20,21}
- ✓ electropolimeritzat sobre la superfície del transductor,^{22,23,24,25,26}
- ✓ incorporat en matrius de *polisulfona*.

Aquesta darrera metodologia apareix com a una nova alternativa als diferents tipus d'estratègies habitualment emprades per a la incorporació de mediadors al sistema quimiosensor, de manera que mereix un estudi en profunditat i per aquest motiu se li dedica el Capítol 5.

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 APARELLS I REACTIUS

4.2.1.1 Aparells

Els aparells emprats per dur a terme mesures voltamperomètriques i amperomètriques, així com els elèctrodes de referència i auxiliar utilitzats, són els descrits a § 2.2.1.1.

4.2.1.2 Reactius

Per a la construcció dels compòsits de grafit-epoxi s'han utilitzat els mateixos reactius que a § 2.2.1.2.

El NADH, la sal de Reinecke i els mediadors ferricianur, MB i o-PDA són de la firma comercial Sigma. El 3,4-DHB i la p-BQ els ha subministrat Aldrich. I el DCPIP, el TTF, el TCNQ i el Nafio[®] s'han comprat a la casa Fluka.

La resta de reactius emprats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

4.2.2 ESTUDI DELS PROCESSOS D'OXIDACIÓ I REDUCCIÓ DELS MEDIADORS SELECCIONATS

A fi de poder incorporar un determinat mediador al sistema de detecció del parell NADH/NAD⁺, cal conèixer amb detall les característiques electroquímiques d'aquest, així com la seva influència en les alteracions de la superfície electròdica. És per aquest motiu que s'han realitzat voltamperogrames cíclics per a cada un dels mediadors, amb l'objectiu de determinar els potencials dels processos d'oxidació i de reducció de cada una de les espècies del parell redox. Cal afegir que la informació extreta d'aquests voltamperogrames és important a l'hora de decidir si un mediador compleix les condicions necessàries per ésser emprat en la detecció d'un sistema redox concret. Per últim, dirigit a resoldre la manca d'informació sobre com afecta la presència en solució de cadascun dels mediadors a les característiques superficials dels compòsits de grafit-epoxi emprats, s'ha dut a terme un estudi exhaustiu de la resposta obtinguda per a cada un d'ells, en absència de NADH, amb la finalitat de determinar els seus paràmetres de calibració característics. Entre aquests paràmetres, mereix un esment especial el pendent de la corba de calibració, degut a què la passivació de la superfície de l'elèctrode s'ha avaluat en base a les variacions d'aquest entre calibratges consecutius. D'altra banda, els paràmetres extrets de les corbes de calibració poden donar una idea de la composició relativa de les espècies oxidada i reduïda per a cada un dels productes comercials, informació que resulta especialment valuosa atès que aquests són resultat d'una mescla d'ambdues espècies en un percentatge desconegut.

4.2.2.1 Caracterització electroquímica

Per a la caracterització electroquímica dels processos redox que tenen lloc entre els mediadors i la superfície dels composts de grafit-epoxi es fa ús de la voltamperometria cíclica. Els voltamperogrames obtinguts fan possible una predicció de l'espècie majoritària a cada un dels parells redox estudiats, alhora que permeten fixar els potencials òptims d'oxidació i de reducció de cada mediador. A més, contenen informació sobre com afecta a les característiques superficials del compost de grafit-epoxi la presència de determinats mediadors en solució.

Primer s'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i es realitza un cicle de potencial entre -0.5 V i 0.8 V. Aquest mateix cicle es repeteix per a cada un dels mediadors, emprant per a cada experiència una solució de mediador de concentració $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, preparada amb la mateixa solució amortidora. Els elèctrodes emprats han estat: un elèctrode de treball (compost de grafit-epoxi), un elèctrode de referència de Ag/AgCl i un elèctrode auxiliar comercial de platí. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

4.2.2.2 Avaluació de la resposta

Mitjançant l'ús d'un sistema amperomètric discret, s'ha intentat obtenir corbes de calibració successives per a cada un dels mediadors, fixant com a potencial de treball de la cel·la electroquímica els potencials d'oxidació i de reducció que apareixen als voltamperogrames obtinguts prèviament. La viabilitat de les mesures per a cada mediador assajat a l'hora de poder fer calibratges a uns potencials determinats ha representat un bon indicador de l'espècie majoritària del parell redox i de la seva estabilitat, atès que els productes comercials, a vegades, són resultat d'una mescla d'espècies de diferent grau d'oxidació. A més, la variació del pendent de les corbes de calibració consecutives, obtingudes amb un mateix elèctrode de treball en les mateixes condicions, ha permès extreure informació sobre l'alteració de la superfície electròdica quan es treballa amb cadascun dels mediadors en solució.

S'aplica per a cada sistema el potencial de treball necessari a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5, en agitació constant, on estan submergits el compost de grafit, que actua com a elèctrode de treball, i els elèctrodes auxiliar i de referència esmentats prèviament. Un cop s'assoleix l'estabilització del sistema, es fan addicions de microvolums d'una solució de mediador 0.01 M. Això es repeteix per a cada un dels mediadors i per a cada un dels potencials de treball fixats prèviament a partir dels voltamperogrames cíclics obtinguts.

4.2.3 SISTEMES QUIMIOSENSORS AMB INCORPORACIÓ DE MEDIADORS EN SOLUCIÓ

4.2.3.1 Reducció de NAD⁺ a NADH

S'estudia la possibilitat de seguir el procés de reducció de NAD⁺ a NADH amb l'ús dels mediadors estudiats, atesa la presència d'un cert percentatge d'espècies reduïdes en la composició comercial d'alguns d'ells. Per això s'addicionen 20 µl d'una solució de NAD⁺ 0.125 M a 10 ml de cadascuna de les solucions de mediador assajades a § 4.2.2.1 (la concentració final de NAD⁺ és 2.5·10⁻⁴ M), i tot seguit es realitza un cicle de potencial entre -0.5 V i 0.8 V.

Amb el mateix sistema amperomètric emprat a § 4.2.2.2 s'ha intentat realitzar calibratges de reducció de NAD⁺ a NADH, mitjançant l'addició de microvolums d'una solució de NAD⁺ 0.01 M a 10 ml de solució 2.4·10⁻⁴ M de cadascun dels mediadors.

4.2.3.2 Oxidació de NADH a NAD⁺

Com en l'apartat anterior, s'han repetit els voltamperogrames cíclics corresponents a les solucions 2.5·10⁻⁴ M de mediador, però ara després d'haver addicionat 20 µl d'una solució 0.125 M de NADH a 10 ml de cada una d'elles (la concentració final de NADH és 2.5·10⁻⁴ M). Un cop comprovat el fet que es pot fer un seguiment de la reacció d'oxidació de NADH a NAD⁺ en presència d'un determinat mediador al potencial d'oxidació propi d'aquest, s'han efectuat calibratges successius d'oxidació de NADH amb l'addició de microvolums d'una solució 0.01 M de NADH a 10 ml de solució 2.4·10⁻⁴ M de cadascun dels mediadors.

4.2.4 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS QUE CONTENEN MEDIADOR AL SEU INTERIOR

La possibilitat de poder modificar químicament o biològica la matriu de compòsits rígids,²⁷ basats en la dispersió de partícules de grafit al si d'una resina epòxica, representa un important avantatge enfront d'electrodes sòlids com els de grafit vitrificat o els de platí, exempts aquests de la versatilitat d'ús que aporta l'opció de poder incorporar modificadors homogeniament a l'interior de la matriu polimèrica resultant.

4.2.4.1 Preparació dels compòsits

Atesa l'elevada solubilitat del ferricianur en medi aquós, només s'han construït compòsits químicament modificats amb els altres sis mediadors.

La metodologia a seguir per a la preparació d'aquests compòsits ha estat la descrita a § 2.2.3.1, només que abans de mesclar la resina epòxica amb el grafit en pols, aquest s'ha barrejat homogeniament amb un 7 % en pes de mediador, excepte per a la sal conductora TTF-TCNQ, cas en què aquest

percentatge ha estat un 9.5% en pes.^{28,29} La sal TTF-TCNQ s'ha obtingut mitjançant la reacció directa entre volums iguals de solucions equimolars 0.1 M de TTF i TCNQ en acetonitril anhidre calent.^{30,31,32,33} Atesa la insolubilitat del producte que s'obté quan es fan reaccionar solucions aquoses equimolars de MB i de la sal de Reinecke,³⁴ també s'han preparat dos compòsits més amb un 6 i un 12 % d'aquest compost a fi de minimitzar les pèrdues de mediador degudes a la seva solubilitat al medi de treball. Tanmateix, amb aquest mateix objectiu, s'ha cobert el compòsit amb MB al seu interior amb una capa de Nafió formada per la deposició de 5 μl d'una solució de Nafió preparada amb 4 volums d'aigua per cada volum de Nafió.

4.2.4.2 Caracterització electroquímica

Es fa ús de la voltamperometria cíclica a fi de determinar els potencials òptims de treball per a l'oxidació de NADH quan s'empra com a elèctrode de treball cadascun dels compòsits modificats amb els diferents mediadors incorporats al seu interior.

Per a cadascuna de les experiències dutes a terme, primer s'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i es realitza un cicle de potencial entre -0.1 V i 0.4 V. Després, aquest mateix cicle es repeteix, però per a una solució de NADH $5.5 \cdot 10^{-4}$ M, preparada amb la mateixa solució amortidora. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

4.2.4.3 Avaluació de la resposta a NADH

Es realitzen mesures amperomètriques que corresponen a l'addició de petits volums d'una solució 0.01 M de NADH a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5, a fi d'obtenir corbes de calibració successives, sense variar les condicions experimentals. En cada cas s'empra com a elèctrode de treball un dels compòsits preparats amb mediador al seu interior i s'aplica el potencial de treball fixat a partir dels voltamperogrames cíclics obtinguts a l'apartat anterior.

La disminució progressiva dels pendents corresponents a corbes de calibració consecutives, obtingudes en les mateixes condicions sense fer cap tractament a l'elèctrode de treball, en aquest cas pot ésser deguda, no només a problemes de passivació de la superfície, sinó també a possibles pèrdues de mediador des de l'interior del compòsit cap a la solució de treball en què es troba submergit. Per aquest motiu s'ha dissenyat una estratègia adreçada a determinar la causa principal de les pèrdues de senyal detectades. Amb aquest objectiu s'ha fet ús d'un sistema redox model com és el Fe^{2+} . L'estudi s'ha fonamentat en l'avaluació comparativa de la resposta a Fe^{2+} obtinguda per a compòsits sense i amb mediador a l'interior després d'haver estat sotmesos a un mateix tractament, que inclou la incubació de l'elèctrode durant un període de temps prefixat en una solució de NADH amb l'aplicació del potencial d'oxidació corresponent al mediador avaluat en cada cas.

Com a pas previ, s'han enregistrat voltamperogrames cíclics en una solució $5.5 \cdot 10^{-4}$ M de Fe^{2+} quan s'utilitza com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi sense mediador i 3 compòsits de grafit-epoxi que incorporen al seu interior els mediadors MB, 3,4-DHB i o-PDA. Després s'ha realitzat, per a cada un dels 3 compòsits amb mediador esmentats, un estudi basat en dur a terme 3 experiències. Amb aquest objectiu es preparen 3 sistemes amperomètrics de mesura, dos d'ells amb compòsits sense mediador i un tercer amb un compòsit amb mediador incorporat al seu interior, que actuen en tots 3 casos com a elèctrode indicador. A la Taula 4.1 es mostra la seqüència de les etapes a seguir per a cadascun dels sistemes dissenyats:

Taula 4.1: Seqüència de passos a seguir per a cadascun dels compòsits amb mediador al seu interior, basada en la realització de tres experiències en paral·lel.

| ELÈCTRODE DE TREBALL | CALIBRATGE DE Fe^{2+} $E_{ap}=0.250$ V | AGITACIÓ (t=4 h) E_{ap} corresponent al del mediador | CALIBRATGE DE Fe^{2+} $E_{ap}=0.250$ V |
|-------------------------|---|--|---|
| Compòsit sense mediador | ✓ | tampó fosfat | ✓ |
| Compòsit sense mediador | ✓ | NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M en tampó fosfat | ✓ |
| Compòsit amb mediador | ✓ | NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M en tampó fosfat | ✓ |

Els calibratges de Fe^{2+} s'obtenen com a resultat d'addicionar petits volums d'una solució de Fe^{2+} 0.01 M a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M, però ara amb el pH ajustat a 5, a fi d'evitar l'oxidació del Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Durant 4 hores s'han mantingut els elèctrodes, que formen part de cada un dels sistemes amperomètrics emprats, submergits en solució tampó, o bé en una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M, amb l'aplicació del potencial de treball que correspon en cada cas al mediador assajat, a fi de comprovar amb els resultats de l'últim calibratge amb Fe^{2+} si la sola aplicació d'un potencial en presència de NADH és suficient per passar la superfície de l'elèctrode.

4.2.5 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA

Les característiques implícites a les molècules de caràcter orgànic, com són els mediadors estudiats, fan possible l'opció d'incorporar-los al sistema de detecció mitjançant la seva adsorció sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi. No obstant això, el fet de posseir pesos moleculars baixos els fan susceptibles de desorbir-se per passar a la solució.

4.2.5.1 Adsorció del mediador

Si bé s'han fet proves amb mediadors adsorbits sobre la superfície dels compòsits mitjançant diferents procediments, amb o sense pretractaments electroquímics previs,^{35,36} finalment la metodologia d'adsorció a seguir s'ha basat en la deposició, sobre la superfície de diferents compòsits de grafit-epoxi, de 20 µl de solució 0.01 M en acetona de cadascun dels cinc mediadors orgànics a avaluar. S'ha deixat evaporar el dissolvent durant 15 minuts i, finalment, s'han rentat els elèctrodes abundantment amb aigua bidestil·lada, a fi d'eliminar l'excés de mediador que no estigués adsorbit a la superfície.

Com en l'apartat anterior s'ha exclòs el ferricianur, degut a què a la bibliografia⁵ queda palesa l'invialibilitat de treballar amb aquest mediador adsorbit amb solucions de pH superior a 3.2.

4.2.5.2 Caracterització electroquímica

Mitjançant els voltamperogrames cíclics obtinguts per a una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M quan s'utilitza cada un dels compòsits preparats a l'apartat precedent com a elèctrode de treball, s'han determinat els potencials òptims de treball per a cadascun dels mediadors adsorbits. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de 50 mV·s⁻¹.

4.2.5.3 Avaluació de la resposta a NADH

L'estudi de l'evolució de corbes de calibració consecutives, obtinguda cadascuna d'elles a partir de la resposta amperomètrica originada quan s'addicionen diferents microvolums d'una solució de NADH 0.01 M a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat i on l'elèctrode de treball és un compòsit amb mediador adsorbit a la seva superfície, permet avaluar les pèrdues de sensibilitat entre anàlisis successives com a una disminució del pendent de les corbes de calibració. El potencial de treball necessari per a cada experiència correspon al fixat pels voltamperogrames obtinguts amb els compòsits amb mediador adsorbit.

4.2.6 *QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT EN MEMBRANES DE NAFIÓ DIPOSITADES SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA*

Les membranes de Nafió han demostrat posseir propietats molt útils en el desenvolupament del camp dels biosensors, algunes pròpies, com per exemple la prevenció que ofereixen envers la passivació i d'altres típiques de la presència d'una membrana sobre la superfície electròdica, com és el fet d'incrementar l'interval de concentracions d'analit que es poden detectar.^{37,38,39} De fet, es presenten com a una alternativa a considerar en el desenvolupament d'interfases biocompatibles amb teixits biològics per a l'obtenció de sensors implantables en organismes vius⁴⁰. La forma senzilla de preparació de les membranes, per immersió de l'elèctrode o, en la majoria de casos, per deposició d'un volum petit de solució sobre la superfície electròdica, amb la consegüent evaporació del dissolvent,

juntament amb l'adhesió elevada a la superfície de l'elèctrode i la lleu adsorció d'aigua en medi aquós de les membranes que es formen, ha portat a la seva incorporació en el disseny de nombrosos biosensors. A tot això s'afegeix el fet de ser una matriu carregada negativament que, per una banda, com a polielectròlit estableix la força iònica a la superfície electròdica, i per una altra, ofereix la possibilitat de retenir al seu interior compostos electroactius carregats positivament,^{41,42} alhora que minimitza la permeabilitat de la membrana a espècies carregades negativament, fet que implica una millora de la selectivitat⁴³ enfront d'interferents com l'àcid ascòrbic^{44,45}. Totes aquestes característiques fan possible la immobilització de mediadors en membranes de Nafíó.

4.2.6.1 Preparació de les membranes de Nafíó amb mediador adsorbit

Sobre la superfície de diferents composts de grafit-epoxi prèviament polits, s'han dipositat 5 µl d'una solució de Nafíó preparada amb 4 volums d'aigua per cada volum de Nafíó. S'ha deixat evaporar el dissolvent amb la consegüent formació de la membrana de Nafíó i, tot seguit, s'ha procedit a l'adsorció del mediador mitjançant la immersió de la superfície electròdica coberta amb aquesta membrana en una solució 0.1 M de cadascun dels mediadors estudiats durant 15 minuts.

4.2.6.2 Caracterització electroquímica

S'ha emprat de nou la voltamperometria cíclica amb l'objectiu de fixar els potencials òptims de treball per a l'oxidació de NADH quan es treballa amb un elèctrode de treball basat en diferents composts modificats amb membranes de Nafíó que contenen mediador adsorbit.

S'ha enregistrat el voltamperograma cíclic obtingut quan es realitza un cicle de potencial entre -0.5 V i 0.8 V amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 a la cel·la electroquímica i, després, l'obtingut quan s'addiciona NADH fins a una concentració final de $5 \cdot 10^{-4}$ M. La velocitat d'escombrat ha estat de 50 mV·s⁻¹.

4.2.6.3 Avaluació de la resposta a NADH

Els elèctrodes preparats s'han avaluat mitjançant l'evolució de corbes de calibració successives obtingudes quan s'addicionen microvolums coneguts d'una solució de NADH 0.01 M a 10 ml de tampó fosfat, amb l'aplicació per a cada quimiosensor del potencial òptim de treball deduït de l'estudi de voltamperometria cíclica realitzat prèviament.

4.2.7 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA

La versatilitat que representa poder obtenir pel·lícules polimèriques de mediadors de gruix controlat, a l'interior de les quals es poden retenir altres espècies químiques, obre un gran ventall de possibilitats en relació a les modificacions químiques dels elèctrodes. Això permet ampliar el camp d'aplicació dels sensors i millorar, en gran mesura, la reproductibilitat de la superfície electròdica, fet que fa possible el control de les característiques dels processos redox que s'empren com a fonament dels sistemes de detecció.

4.2.7.1 Electropolimerització del mediador

El procés d'electropolimerització de cadascun dels mediadors en estudi s'ha dut a terme seguint 3 passos^{23,46}.

En primer lloc, s'ha efectuat una etapa de *pretractament*, destinada a preparar la superfície del compost a fi que presenti les mateixes característiques en tots els casos i, per tant, que el procés sigui el més reproducible possible. Per al pretractament, es submergeixen els elèctrodes a una cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i es realitzen cicles consecutius de potencial entre -0.2 V i 0.1 V durant 10 minuts.

Després té lloc el procés d'*electropolimerització* pròpiament dit, dut a terme en una cel·la electroquímica que conté una solució de mediador de concentració coneguda, a la qual s'aplica un potencial constant, o bé es realitzen cicles successius de potencial.

Finalment, el darrer pas correspon a l'etapa d'*activació* que ve donada per 10 minuts més de cicles consecutius de potencial, però ara entre valors que depenen del mediador electropolimeritzat.

4.2.7.2 Caracterització electroquímica

En aquest cas, la voltamperometria cíclica a més de permetre fixar els potencials de treball òptims per a cada un dels mediadors, aporta informació de gran utilitat referent a com s'ha dut a terme el procés d'electropolimerització, fet que representa un ajut important en l'etapa d'optimització d'aquest procés.

El procediment a seguir ha estat el mateix que en els apartats anteriors, basat en enregistrar inicialment el voltamperograma corresponent a tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i, posteriorment, el corresponent a una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M preparada amb la mateixa solució amortidora.

4.2.7.3 Optimització del procés d'electropolimerització

A fi d'optimitzar el procés d'electropolimerització, s'ha electropolimeritzat cadascun dels mediadors mitjançant l'aplicació de diferents potencials constants o de cicles de potencial entre valors variats. Un

cop fixat el tractament electroquímic més adequat, s'ha variat la concentració de la solució de mediador (1, 5 i 10 mM), així com el temps d'electropolimerització (3, 6 i 12 min), fins a obtenir unes condicions òptimes d'electropolimerització, enteses com a aquelles condicions que han proporcionat les corbes de calibració per a NADH amb els pendents més elevats.

4.2.7.4 Avaluació de la resposta a NADH

Finalment, un cop fixades les condicions òptimes d'electropolimerització, s'han avaluat els quimiosensors preparats sota aquestes condicions, a partir de corbes de calibració successives resultants d'addicionar microvolums coneguts d'una solució de NADH 0.01 M a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5.

4.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.3.1 ESTUDI DELS PROCESSOS D'OXIDACIÓ I REDUCCIÓ DELS MEDIADORS SELECCIONATS

4.3.1.1 Caracterització electroquímica

Dels voltamperogrames representats a la Figura 4.3 s'han extret els potencials òptims d'oxidació i de reducció, mostrats a la Taula 4.2, per a cadascun dels mediadors assajats en solució, quan s'empra un compost de grafit-epoxi com a elèctrode indicador.

Taula 4.2: Potencials d'oxidació i reducció òptims per a solucions de diferents mediadors, extrets dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empra un compost de grafit-epoxi com a elèctrode de treball.

| MEDIADOR EN SOLUCIÓ | E_{pa} (V) | E_{pc} (V) |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
| Ferricianur | 0.370 | -0.090 |
| MB | -0.055 / 0.540 | -0.140 |
| p-BQ | 0.540 | -0.190 |
| DCPIP | 0.115 / 0.300 / 0.530 | -0.075 / 0.200 / 0.450 |
| o-PDA | 0.030 / 0.400 | -0.050 / 0.260 |
| 3,4-DHB | -0.100 / 0.460 | -0.160 / 0.110 |

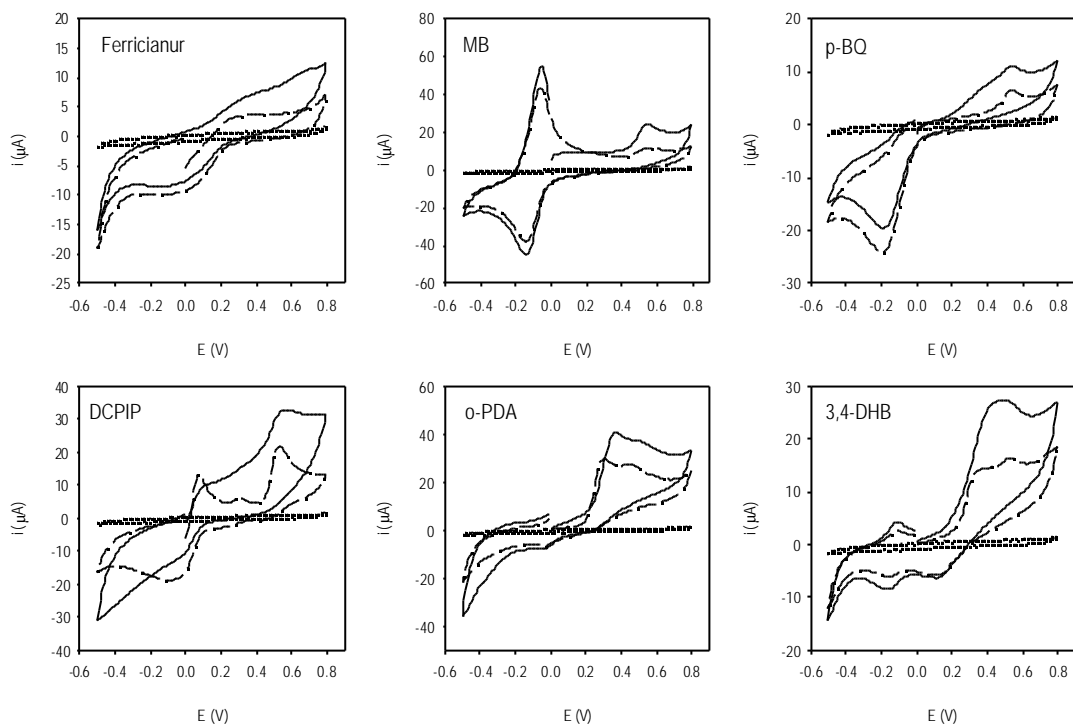
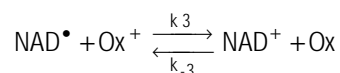
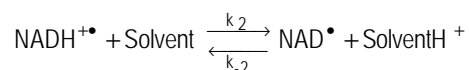
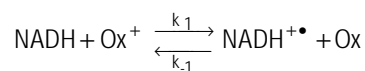


Figura 4.3: Voltamperogrames cíclics, que s'obtenen de la mesura d'intensitat obtinguda com a resultat de l'escombrat de potencial, per a cada un dels mediadors assajats. A la solució inicial, tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 (línia de punts), se li ha addicionat mediador fins assolir una concentració de $2.5 \cdot 10^{-4}$ M (línia discontinua) i, finalment, NADH fins a la mateixa concentració (línia contínua). Com a elèctrode de treball s'ha emprat un transductor convencional de grafit-epoxi. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'obtenció de varis pics catòdics i anòdics per a un determinat mediador dóna idea de la complexitat dels processos electroquímics que experimenten aquestes espècies electroactives. En la majoria de casos intervé més d'un electró, fet que afavoreix la transferència electrònica que té lloc durant l'oxidació de NADH, atès que aquesta apareix a la bibliografia com a un procés basat en diverses etapes. El mecanisme proposat³⁴ per a l'oxidació electroquímica de NADH consta d'una seqüència de 3 passos en què intervé un electró (e), un ió hidrogen (H^+) i un altre electró (e), respectivament.



4.3.1.2 Avaluació de la resposta

La Taula 4.3 inclou els paràmetres de calibració obtinguts quan es representen les mesures d'intensitat de corrent adquirides en un sistema amperomètric, com a resultat d'addicions successives de petits volums d'una solució de mediador a una cel·la a la qual se li està aplicant un potencial de treball que depèn del mediador que s'està avaluant.

Taula 4.3: Paràmetres de calibració de les corbes de calibració obtingudes per a cadascun dels mediadors assajats mitjançant addicions de microvolums de solucions $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de mediador a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Com a elèctrode de treball s'ha emprat un compost de grafit-epoxi. Tots els càlculs s'han fet per a $n=3$.

| MEDIADOR EN SOLUCIÓ | E_{ap} (V) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu A/M$) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) |
|---------------------|--------------|---|--------------------------|----------------------------|
| Ferricianur | -0.090 | -49781 | 0.9993 a 0.9997 | 8 |
| MB | 0.540 | 3393 | 0.9969 a 0.9984 | 11 |
| | -0.140 | -38942 | 0.9948 a 0.9999 | 4 |
| p-BQ | 0.540 | 4398 | 0.9990 a 0.9998 | 4 |
| | -0.180 | -191964 | 0.9991 a 0.9999 | 13 |
| DCPIP | 0.115 | 100 | 0.9994 a 0.9997 | 18 |
| | -0.075 | -46706 | 0.9990 a 0.9998 | 2 |
| o-PDA | 0.400 | 176333 | 0.9991 a 0.9996 | 17 |
| 3,4-DHB | 0.460 | 109838 | 0.9984 a 0.9986 | 2 |

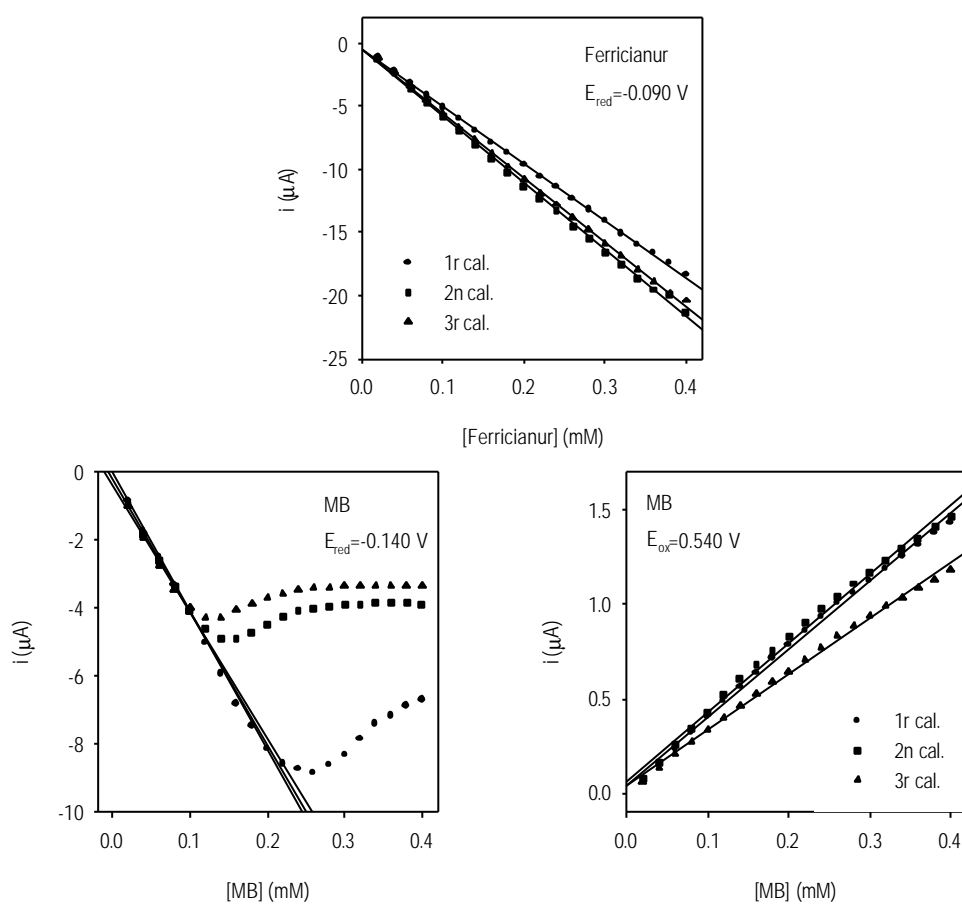
Cal notar que als voltamperogrames de la Figura 4.3 i, per tant, a les dades recollides a la Taula 4.2, apareixen més potencials de treball possibles que els considerats a la Taula 4.3. Aquest resultat és degut a la impossibilitat palesa per obtenir corbes de calibració a aquests altres potencials, fet que proporciona informació sobre quina és l'espècie majoritària del parell redox de cada mediador.

Segons el que s'acaba de dir, mentre que l'únic mediador que es troba pur en un sol estat d'oxidació és el ferricianur, fet que està d'acord amb la inviabilitat d'obtenir una corba de calibració per al seu procés d'oxidació, la resta són mesclades d'espècies amb diferents estats d'oxidació, si bé per a dos dels mediadors, o-PDA i 3,4-DHB, sembla predominar l'espècie reduïda, cosa que dificulta l'obtenció d'un senyal mesurable quan s'aplica un potencial de reducció.

D'altra banda, la reproductibilitat donada com la desviació estàndard dels pendents obtinguts per a corbes de calibració successives efectuades en les mateixes condicions, juntament amb l'observació

de la seva evolució, esdevé un clar indicador de què alguns d'aquests mediadors, en l'interval de concentracions avaluat, afecten d'alguna forma a la superfície del compost. En alguns d'aquests casos, sembla fer-se palesa una passivació de la superfície, atès que els pendents disminueixen progressivament entre calibratges consecutius, tal com es pot veure a la Figura 4.4.

Com a resultat de les dades mostrades a la Taula 4.3 i la Figura 4.4, es conclou que els mediadors MB i DCPIP ofereixen senyals per a processos de reducció amb una bona sensibilitat i una mínima passivació de la superfície de l'electrode, mentre que les millors respostes per a processos d'oxidació del mediador s'obtenen amb p-BQ i 3,4-DHB.



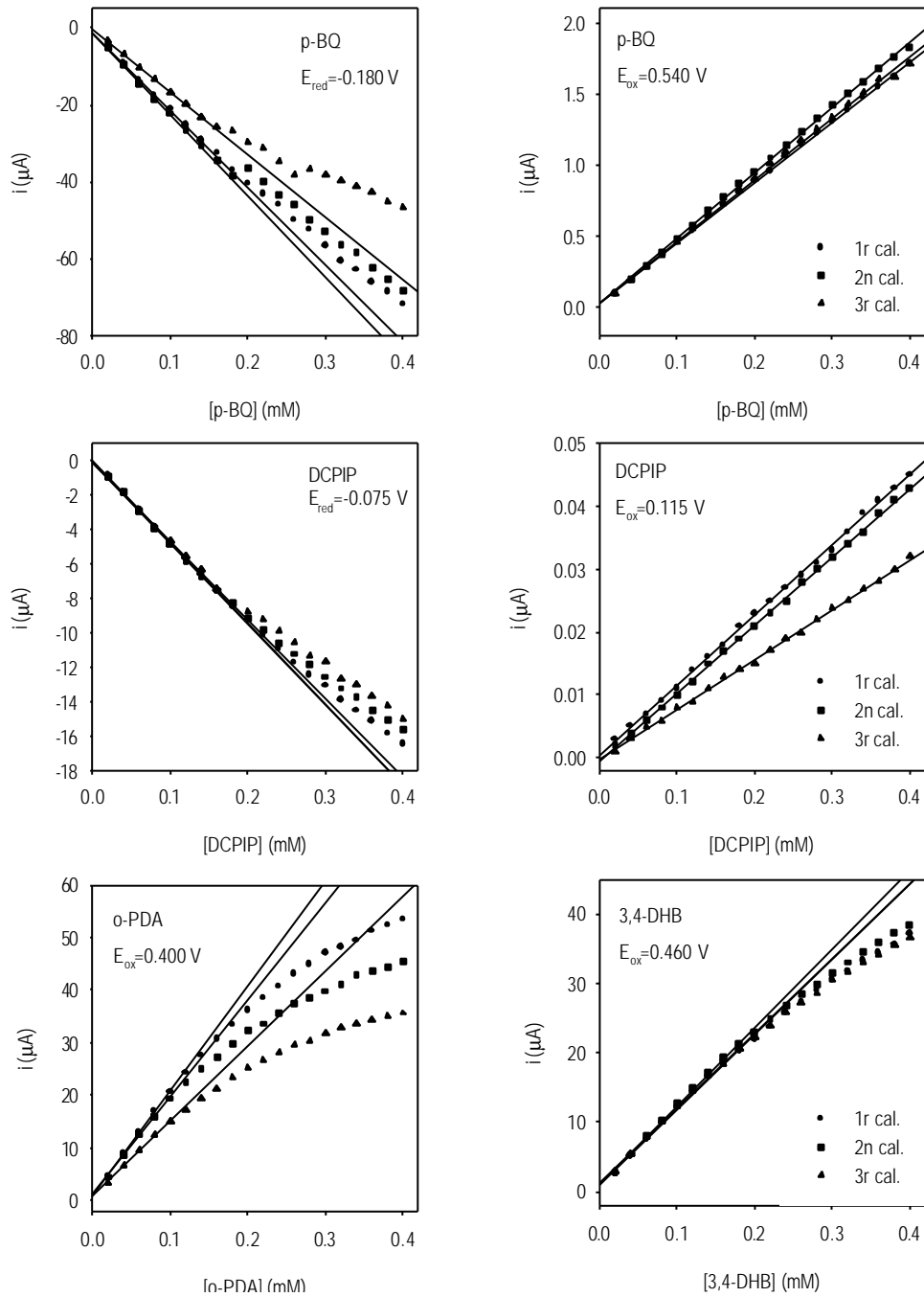


Figura 4.4: Corbes de calibració successives, corresponents a l'oxidació i a la reducció per a cadascun dels mediadors assajats en solució, sobre la superfície d'un transductor basat en un compost de grafit-epoxi. L'interval de concentracions avaluat va de $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ fins a $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. A cada gràfic s'indica el potencial aplicat.

4.3.2 SISTEMES QUIMIOSENSORS AMB INCORPORACIÓ DE MEDIADORS EN SOLUCIÓ

4.3.2.1 Reducció de NAD⁺ a NADH

Els voltamperogrames obtinguts per a cadascun dels mediadors en presència de NAD⁺, van confirmar el fet que teòricament es podria fer un seguiment de la reacció de reducció de NAD⁺ a NADH als potencials de reducció de les espècies oxidades que formen part de cadascun dels parells redox dels mediadors en estudi.

Malgrat això, ha estat impossible obtenir mesures d'intensitat de corrent per a la reducció de NAD⁺ a NADH en presència d'algun dels mediadors en estudi. Aquests resultats estan d'acord amb el fet, descrit a la bibliografia,⁴⁷ segons el qual les molècules de NAD⁺ capten el primer electró amb relativa facilitat, mentre que la consegüent reacció de transferència d'un protó resulta ésser inhibida per reaccions laterals, com la dimerització del radical lliure prèviament format, i per l'adsorció de determinats subproductes sobre la superfície de l'elèctrode (vegeu Figura 4.5). Com a conseqüència, cap dels mediadors assajats esdevé un modificador eficaç adreçat a fer viable la reacció de reducció de NAD⁺.

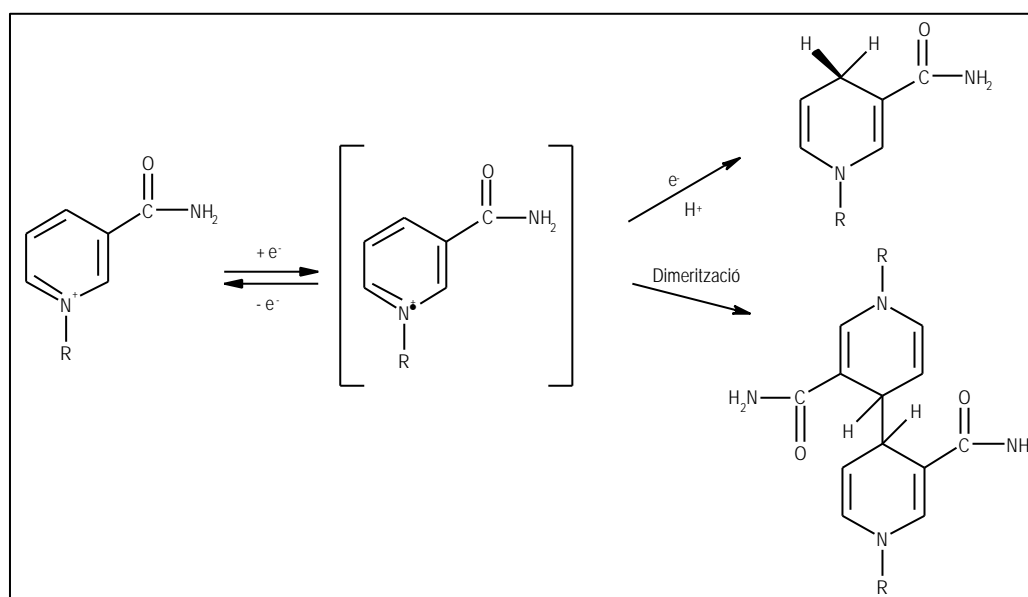


Figura 4.5: Reducció electroquímica de NAD⁺ per donar NADH i un dímer com a producte majoritari.

4.3.2.2 Oxidació de NADH a NAD⁺

A la Figura 4.3, on s'inclouen els voltamperogrames cíclics obtinguts per a cadascun dels mediadors en presència de NADH, s'observa com resten invariables els potencials d'oxidació dels mediadors amb l'addició de NADH, mentre que els valors d'intensitat de corrent han augmentat. Atès que a aquests potencials de treball l'oxidació de NADH és menyspreable, l'augment d'intensitat és conseqüència de què la concentració de mediador reduït augmenta quan s'addiciona NADH, fet que sembla confirmar que l'oxidació del NADH té lloc a través d'una reacció química amb el mediador oxidat. Això permet mesurar NADH de manera indirecta a través dels mediadors i, per tant, permet treballar a uns potencials més baixos, corresponents als potencials d'oxidació dels mediadors.

A la Taula 4.4 es donen els paràmetres de calibració per a corbes de calibració successives, de l'oxidació de NADH, en presència dels diferents mediadors assajats en solució (vegeu Figura 4.6).

Taula 4.4: Paràmetres de calibració obtinguts de l'avaluació de l'oxidació de NADH en presència de diferents mediadors, corresponents a les dades de l'ajust lineal de les corbes de calibració representades a la Figura 4.5. L'interval lineal s'ha avaluat fins a una concentració de NADH igual a 0.28 mM. Per a tots els casos s'han considerat tres corbes de calibració.

| MEDIADOR EN SOLUCIÓ | E _{ap} (V) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (μA/M) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) | INTERVAL LINEAL (mM) |
|---------------------|---------------------|--|--------------------------|----------------------------|----------------------|
| Ferricianur | 0.370 | 6402 | 0.9990 a 0.9994 | 2 | 0.13 - 0.28 |
| MB | 0.050 | 1929 | 0.9980 a 0.9991 | 7 | 0.12 - 0.28 |
| p-BQ | 0.540 | 37412 | 0.9989 a 0.9996 | 3 | 0.12 - 0.28 |
| DCPIP | 0.115 | 46453 | 0.9987 a 0.9996 | 6 | 0.11 - 0.28 |
| o-PDA | 0.030 | 1714 | 0.9990 a 0.9999 | 9 | 0.01 - 0.22 |
| 3,4-DHB | -0.100 | 1933 | 0.9982 a 0.9994 | 6 | 0.006 - 0.06 |

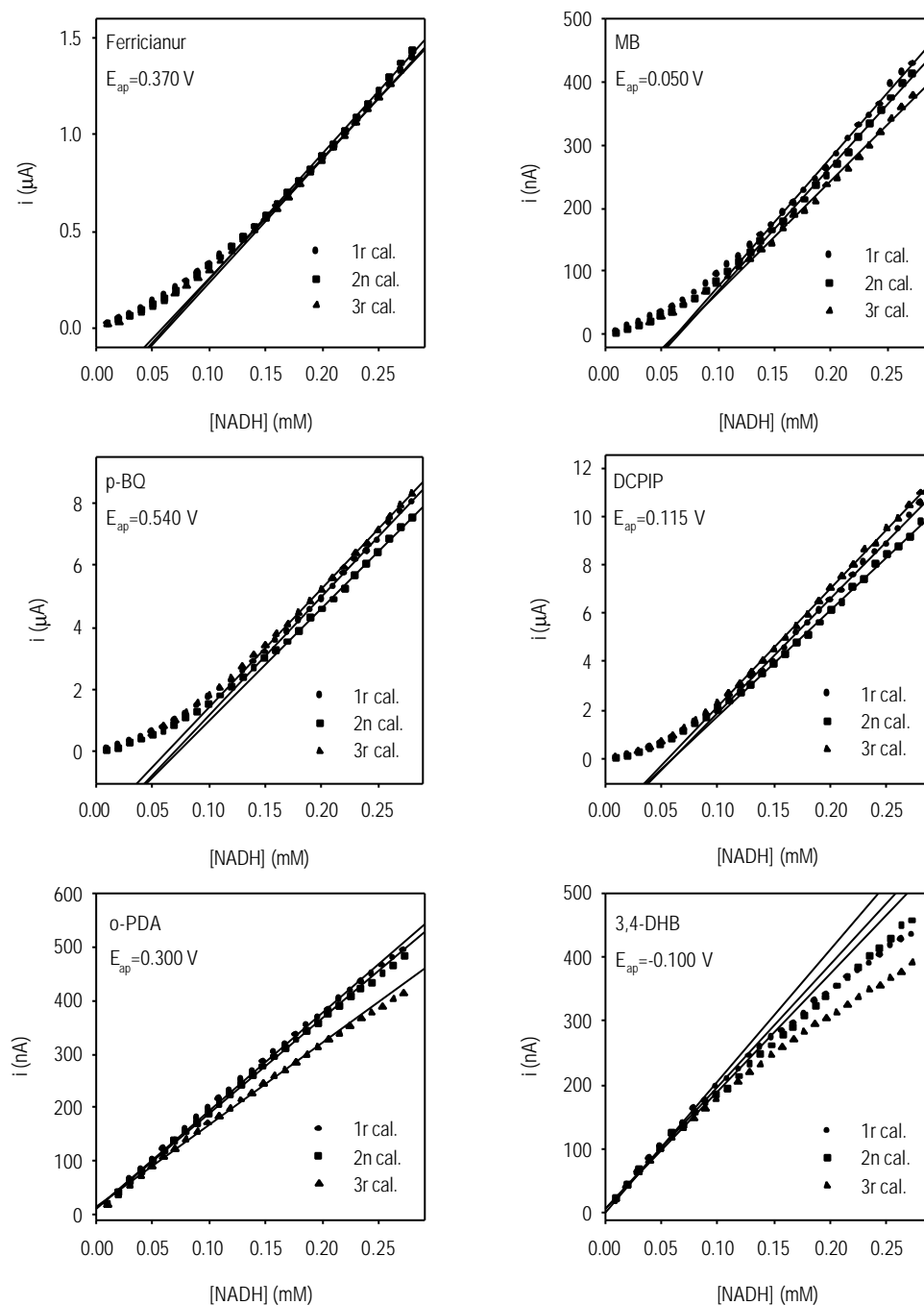


Figura 4.6: Corbes de calibració successives, corresponents a l'oxidació de NADH en presència de diferents mediadors en solució, en un sistema electrodic on el transductor és un compost de grafit-epoxi. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $1.0 \cdot 10^{-5}$ M a $2.8 \cdot 10^{-4}$ M. A cada gràfic s'indica el mediador emprat i el potencial aplicat. La concentració de mediador a la solució inicial és igual a $2.4 \cdot 10^{-4}$ M per a tots els casos.

Aquests resultats confirmen la viabilitat d'incorporar els mediadors ferricianur i p-BQ en dissolució al sistema de detecció de NADH, ja que confereixen una bona sensibilitat al sistema i eviten la passivació de l'elèctrode. De totes formes, el potencial de treball necessari quan es treballa amb p-BQ en solució és el més elevat de tots, fet que implica una limitació en la selectivitat que podrà oferir el sensor. Per altra banda, els sistemes que incorporen MB, DCPIP, 3,4-DHB i, especialment o-PDA, com a mediadors, sembla ésser que poden alterar de forma contraproduent la superfície de l'elèctrode.

4.3.3 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS QUE CONTENEN MEDIADOR AL SEU INTERIOR

4.3.3.1 Preparació dels compòsits

Només els compòsits de grafit-epoxi preparats amb MB, DCPIP, o-PDA, 3,4-DHB i la sal conductora TTF-TCNQ⁴⁸ al seu interior han curat correctament, si bé l'anàlisi detallada de la seva superfície mostra petites irregularitats que poden indicar lleugeres pèrdues de mediador, com a conseqüència de què no hagi quedat ben retingut a la matriu polimèrica.

4.3.3.2 Caracterització electroquímica

A la Taula 4.5 es recullen els potencials òptims de treball per a l'oxidació de NADH quan s'empren com a elèctrode de treball diferents compòsits amb mediador al seu interior. Aquests potencials corresponen als dels pics d'oxidació mostrats als voltamperogrames cíclics corresponents.

Taula 4.5: Potencials òptims d'oxidació de NADH extrets dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empren compòsits de grafit-epoxi amb diferents mediadors incorporats a la matriu polimèrica.

| MEDIADOR INCORPORAT DINS DEL COMPÒSIT | E_{pa} (V) |
|---------------------------------------|--------------|
| MB (7 %) | 0.050 |
| MB + sal de Reinecke (6 %) | 0 |
| MB + sal de Reinecke (12 %) | -0.040 |
| DCPIP (7 %) | 0.400 |
| o-PDA (7 %) | 0.200 |
| 3,4-DHB (7 %) | 0.250 |
| TTF-TCNQ (9.5 %) | 0.300 |

Cal destacar que els potencials d'oxidació observats quan s'empra un compost amb el mediador incorporat en el seu interior, excepte quan es tracta del mediador MB, són molt més grans que els obtinguts quan el mediador es troba en solució (vegeu Taula 4.4). Aquest fet pot ésser conseqüència de la limitació en la mobilitat del mediador que suposa la seva retenció a l'interior d'una matriu rígida com són els composts de grafit-epoxi. No obstant això, cal pensar que s'estableix un contacte elèctric adequat entre les partícules de grafit i el mediador retingut i que, per tant, s'afavoreix en certa manera la transferència electrònica entre ambdós que fa possible l'oxidació de NADH a través del mediador.

4.3.3.3 Avaluació de la resposta a NADH

La disminució progressiva del pendent de les corbes de calibració successives, obtingudes per a l'oxidació de NADH quan s'empra com a elèctrode de treball cadascun dels composts preparats amb mediador al seu interior, porta a pensar en una pèrdua del mediador per dissolució (fet que en alguns casos, com per exemple amb MB o DCPIP, es corrobora per l'acoloriment de la solució), a més de la possible passivació de la superfície de l'elèctrode (vegeu Figura 4.7).

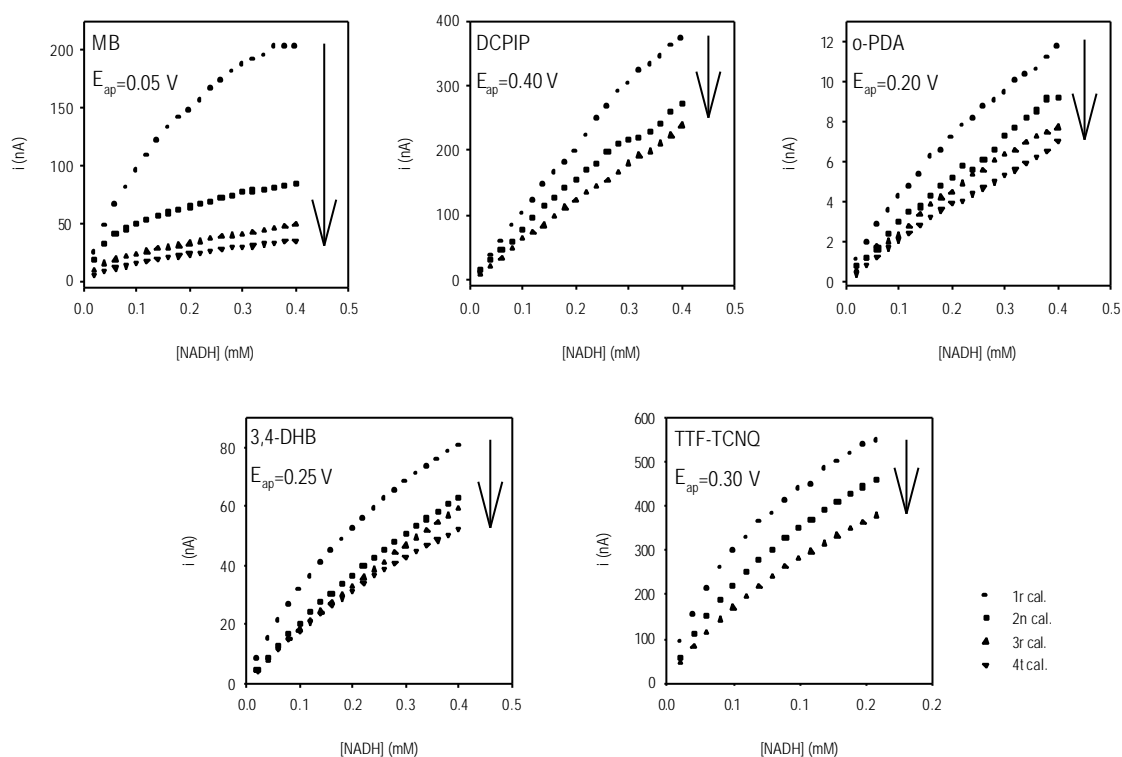


Figura 4.7: Corbes de calibració successives que corresponen a l'oxidació de NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb mediador al seu interior. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $2 \cdot 10^{-5}$ M a $4 \cdot 10^{-4}$ M, excepte per a l'elèctrode amb TTF-TCNQ, que va de $1.0 \cdot 10^{-5}$ M a $1.6 \cdot 10^{-4}$ M. A cada gràfic s'indica el mediador incorporat al compost i el potencial de treball.

A més, també cal destacar que s'obté molt poc senyal amb aquest tipus de quimiosensor, probablement com a conseqüència de la presència a la superfície de l'elèctrode de poca quantitat de mediador disponible per a reaccionar amb el NADH, així com de la disminució de la conductivitat que experimenta el transductor pel fet de contenir una nova espècie a la seva matriu. Només els compòsits preparats amb DCPIP i amb TTF-TCNQ han mostrat sensibilitats una mica més elevades. En el cas del DCPIP possiblement es deu a l'elevat potencial de treball aplicat, que permet l'oxidació directa sobre la superfície electròdica d'algunes molècules de NADH. D'altra banda, el cas de la sal conductora TTF-TCNQ és en certa manera diferent, atès que les espècies que realment actuaran com a mediadors són els ions TTF⁺ i TCNQ, que han de difondre des de la superfície del compòsit cap a la solució. La sal TTF-TCNQ és insoluble en aigua quan es troba en forma cristal·lina, però l'aplicació d'un potencial adequat o la seva implicació en reaccions redox, causen la destrucció de la xarxa cristal·lina i la consegüent obtenció dels ions TTF⁺ i TCNQ més o menys solubles en medi aquós.⁴⁹ Per tant, en aquest cas la quantitat de mediador alliberat per dissolució en principi ha de ser molt petita⁵⁰, atès que a diferència del que passa amb els altres compòsits, ara es tracta d'un procés controlat. Aquesta millora en la retenció del mediador a l'interior del compòsit i, per tant, també a la superfície electròdica, pot ser la causa de l'obtenció d'una major sensibilitat. Ara bé, la disminució progressiva dels pendents associats a corbes de calibració successives també en el cas dels compòsits amb TTF-TCNQ, s'atribueix tant a la dissolució necessària de les espècies TTF⁺ i TCNQ, a fi de que actuïn com a donador i acceptor d'electrons respectivament, així com a la passivació de la superfície que possiblement té lloc quan s'aplica un potencial de 0.3 V.

Amb l'objectiu de descobrir la causa principal de la pèrdua de sensibilitat en calibratges successius, s'ha realitzat un estudi comparatiu de la resposta dels compòsits amb MB, o-PDA i 3,4-DHB vers solucions de Fe²⁺, considerades com a un sistema model. Per aquest motiu, com a pas previ, s'han enregistrat els voltamperogrames obtinguts amb solucions de Fe²⁺ quan es va canviant l'elèctrode de treball per cadascun dels compòsits amb mediador al seu interior, i s'ha observat que el valor del potencial d'oxidació de Fe²⁺ a Fe³⁺ es manté invariable i igual a 0.250 V per a tots ells. Aleshores s'ha seguit, per a cada un dels compòsits amb mediador al seu interior, la seqüència exposada a la Taula 4.1, basada en dur a terme 3 experiències en paral·lel, cada una amb un elèctrode de treball diferent. Com a resultat, per a cada estudi realitzat a fi d'avaluar un dels compòsits amb mediador al seu interior, s'han obtingut corbes de calibració per a l'oxidació de Fe²⁺ amb cadascun dels elèctrodes de treball, abans i després d'incubar els elèctrodes en una solució de NADH amb l'aplicació del potencial de treball, per a la determinació de NADH, propi del compòsit amb mediador. A la Figura 4.8 es mostren les corbes de calibració obtingudes per a l'estudi amb 3,4-DHB, mentre que la Taula 4.6 recull els resultats de l'estudi comparatiu dut a terme per als compòsits preparats amb els 3 mediadors estudiats. Aquests resultats s'han expressat com a pèrdues de sensibilitat relatives, amb l'objectiu d'avaluar la disminució del senyal deguda a la pèrdua de mediador. Aquest paràmetre s'ha calculat com a percentatge de la relació entre les sensibilitats, corregides amb el valor corresponent a un elèctrode sense mediador incubat en tampó fosfat emprat com a blanc, associades a les corbes de calibració per

a Fe^{2+} efectuades abans i després del període d'incubació en una solució de NADH ((sensibilitat després de la incubació) / (sensibilitat abans de la incubació)·100).

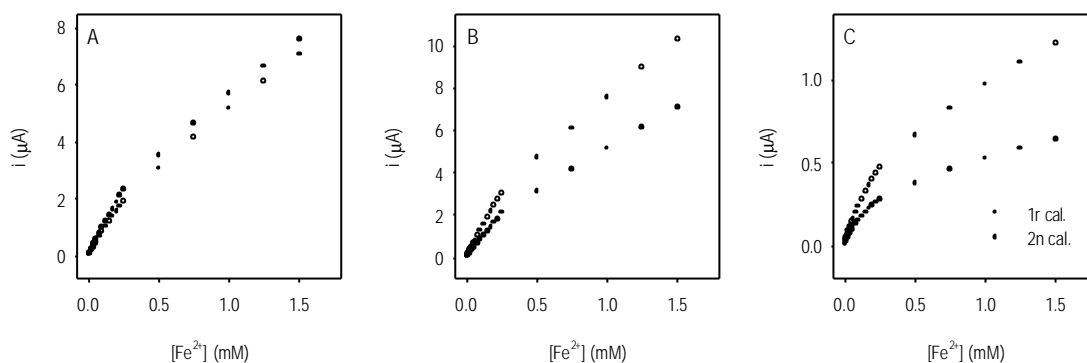


Figura 4.8: Corbes de calibració per a Fe^{2+} quan s'empra com a elèctrode de treball (A) i (B) un transductor convencional basat en un compost de grafit-epoxi i (C) un compost de grafit-epoxi modificat amb 3,4-DHB al seu interior. Entre el primer i el segon calibratge, els elèctrodes s'han mantingut submergits durant 4 hores, amb l'aplicació d'un potencial constant de 0.250 V, (A) en una solució de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5 i (B) i (C) en una dissolució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M. L'interval de concentracions de Fe^{2+} avaluat va de $5.0 \cdot 10^{-6}$ M a $1.5 \cdot 10^{-3}$ M. El potencial de treball és 0.250 V.

Taula 4.6: Resultats de l'estudi comparatiu realitzat amb 3 composts modificats amb MB, o-PDA i 3,4-DHB al seu interior, respectivament, expressats com a pèrdues de sensibilitat, representades pel percentatge de disminució del pendent de dues corbes de calibració successives per a Fe^{2+} , amb un període d'incubació de 4h en una solució de NADH $2 \cdot 10^{-4}$ M entremig amb l'aplicació de 0.050 V per a l'estudi amb MB, 0.200 V per al realitzat amb o-PDA i 0.250 V per al dut a terme amb 3,4-DHB. A aquests valors se'ls hi ha restat el blanc, considerat com el valor obtingut per un compost de grafit-epoxi que s'ha mantingut submergit en tampó fosfat durant el període d'incubació.

| ELÈCTRODE DE TREBALL EMPRAT | E_{ap} (V) | PÈRDUA DE SENSIBILITAT (%) | | |
|---|--------------|----------------------------|-------|---------|
| | | MB | o-PDA | 3,4-DHB |
| Compost de grafit-epoxi | 0.250 | 24 | 30 | 31 |
| Compost de grafit-epoxi amb mediador incorporat a la pasta | 0.250 | 37 | 151 | 55 |

La pèrdua de sensibilitat que resulta d'incubar un compost de grafit-epoxi durant 4h en una solució de NADH sembla ser funció del potencial aplicat durant aquest temps, essent més important per a potencials més elevats. A més, els valors representats a la Taula 4.6 confirmen que, a part de la

passivació de la superfície de l'elèctrode, té lloc una disminució del senyal addicional en els compòsits modificats amb mediador, causada per la pèrdua d'aquest cap a la solució en què es troben submergits els elèctrodes, fet que esdevé molt important en el cas de l'o-PDA.

D'acord amb les referències que apareixen a la bibliografia, l'ús de la sal de Reinecke (tetraiodanat-diamina-cromat),³³ avaluat a partir dels resultats obtinguts amb dos compòsits preparats amb un 6 i un 12 % del producte de la reacció del MB amb aquesta sal, ha suposat una important millora de les característiques de resposta a NADH. Tal com es pot veure a la Figura 4.9, la representació de corbes de calibració successives per a ambdós compòsits permet afirmar que el compòsit que conté un 12 % del producte format (MB amb la sal de Reinecke) presenta una disminució de sensibilitat mínima (RSD= 5 %, n= 3, sensibilitat= 3.1 mA/M, interval lineal= $4.0 \cdot 10^{-6}$ a $4.8 \cdot 10^{-5}$ M) en comparació amb els resultats que s'obtenen per al compòsit amb un 6 % del mateix producte de reacció (RSD= 37 %, n= 3, sensibilitat= 0.9 mA/M, interval lineal= $2.0 \cdot 10^{-5}$ a $1.0 \cdot 10^{-4}$ M). Per tant, els resultats confirmen l'augment de la insolubilitat, aportat pels compostos formats amb la sal de Reinecke, que dificulta la sortida del mediador des de l'interior de la matriu polimèrica cap al si de la solució.

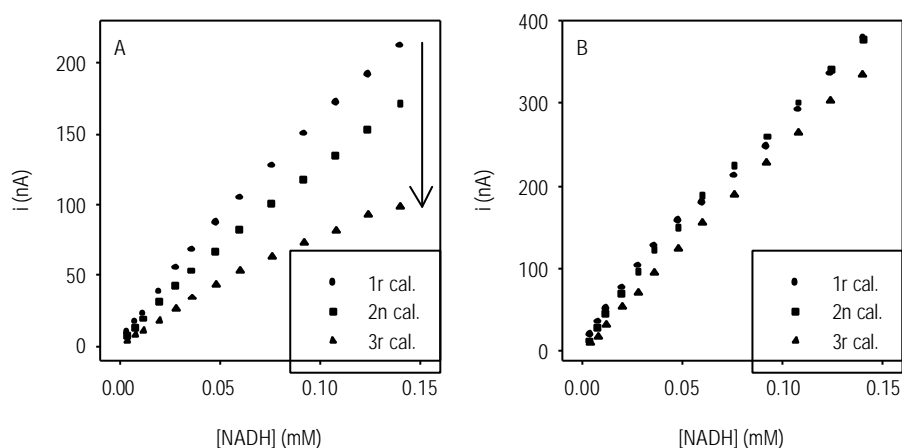


Figura 4.9: Corbes de calibració consecutives per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi que conté al seu interior (A) un 6 % i (B) un 12 % del producte que resulta de la reacció entre el MB i la sal de Reinecke. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $4.0 \cdot 10^{-6}$ M a $2.4 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball ha estat (A) 0 V i (B) -0.04 V, respectivament.

Amb el mateix objectiu, també s'ha estudiat la resposta a NADH dels compòsits amb MB recoberts amb una capa de Nafió. Les membranes de Nafió no tan sols poden ajudar a retenir el mediador al compòsit, sinó que a més es caracteritzen per prevenir la passivació de la superfície electròdica. La Figura 4.10 mostra com la pèrdua de sensibilitat entre corbes de calibració successives, tot i ser encara considerable (RSD= 13 %, n= 3), presenta una certa millora, segurament causada per l'impediment de la membrana de Nafió carregada negativament de la pèrdua cap a la solució de les molècules

catiòniques de MB necessàries perquè la reacció es pugui dur a terme. A més d'aquesta millora de la reproductibilitat, també destaca l'increment de sensibilitat (sensibilitat= $2996 \mu\text{A}/\text{M}$) respecte als valors obtinguts per a composts amb MB sense membrana de Nafió. Això pot ser degut al fet que el mediador no es perd amb tanta facilitat com a conseqüència de l'impediment que suposa la membrana de Nafió i, per tant, els composts contenen una major quantitat de mediador a la seva superfície que, en definitiva, és responsable de generar intensitats de corrent més elevades. Per últim, s'observa especialment a baixes concentracions de NADH, l'increment de l'interval lineal de resposta a NADH causat per la presència d'una membrana sobre la superfície sensora.

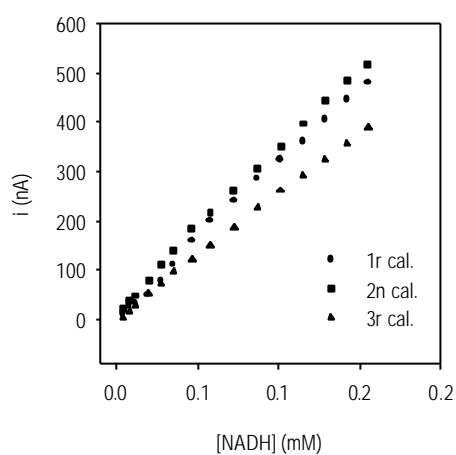


Figura 4.10: Corbes de calibració consecutives per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi que conté al seu interior MB i que s'ha cobert amb una membrana de Nafió. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $4.0 \cdot 10^{-6}$ M a $1.6 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball ha estat 0.05 V.

De tots aquests resultats es pot concloure que l'ús de composts amb mediadors redox al seu interior no resulta ésser una estratègia de treball adequada per dos motius. Per una banda, té lloc la pèrdua de mediador cap al si de la solució, tot i que aquest fenomen es pot minimitzar insolubilitzant-lo amb la sal de Reinecke o, en alguns casos, cobrint la superfície electròdica amb una membrana de Nafió. Per altra banda, s'obtenen senyals petits, fet que es creu que és degut a la poca quantitat de mediador disponible a la superfície de l'elèctrode i a la disminució de la conductivitat del transductor.

4.3.4 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA

4.3.4.1 Caracterització electroquímica

De la Figura 4.11, que correspon als voltamperogrames cíclics obtinguts per a una solució de NADH quan s'utilitza com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb el mediador adsorbit sobre la seva superfície, s'obtenen els potencials òptims de treball, recollits a la Taula 4.7, per a cadascun dels mediadors adsorbits.

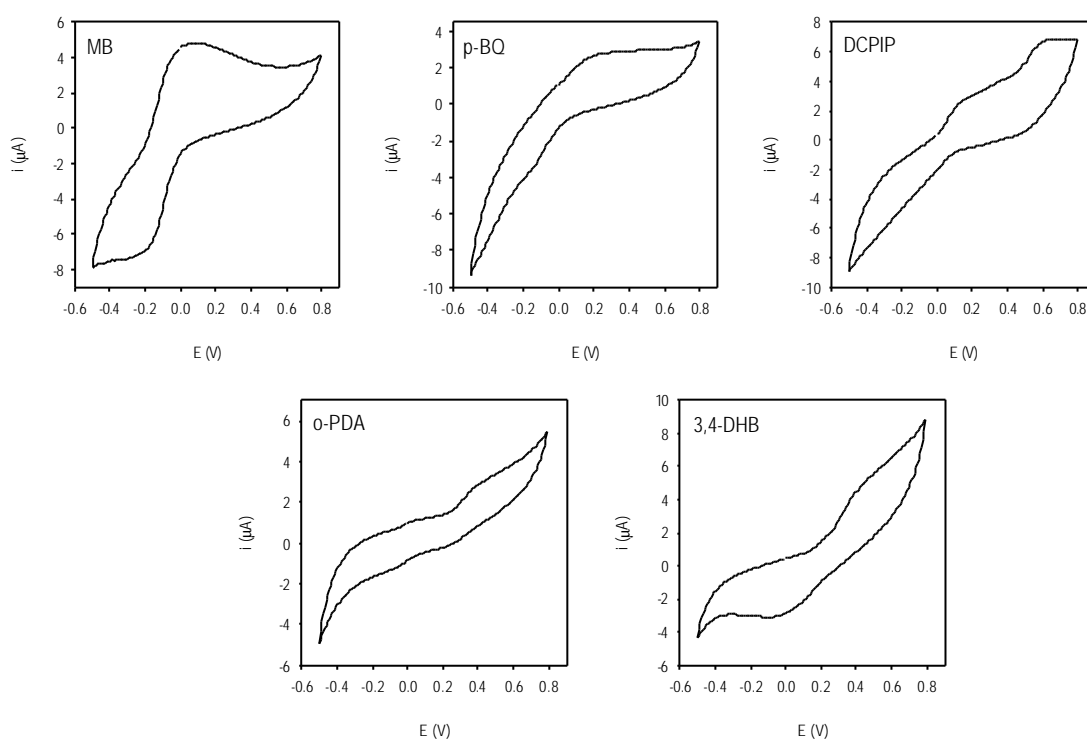


Figura 4.11: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode indicador un compost de grafit-epoxi amb cadascun dels mediadors estudiats adsorbit sobre la seva superfície. La cel·la electroquímica conté una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M en tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.5. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Taula 4.7: Potencials òptims d'oxidació de NADH extrets dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empren, com a elèctrode de treball, compòsits de grafit-epoxi amb diferents mediadors adsorbts sobre la seva superfície.

| MEDIADOR ADSORBIT SOBRE LA SUPERFÍCIE DEL COMPÒSIT | E_{pa} (V) |
|--|--------------|
| MB | 0.080 |
| p-BQ | 0.200 |
| DCPIP | 0.130 |
| o-PDA | 0.100 |
| 3,4-DHB | 0.250 |

De nou es comprova que, per a gairebé tots els casos excepte per a la p-BQ, els potencials d'oxidació obtinguts quan el mediador està adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode són superiors als que s'observen quan el mediador s'incorpora al sistema en solució (vegeu Taula 4.4). Aquest fet contradiu el que descriuen *Gorton et al.*⁶. La divergència palesa pot ser deguda a que els mediadors no hagin estat correctament adsorbts sobre la superfície electròdica, fet que sembla ésser recolzat per l'increment del sobrepotencial necessari per a que tingui lloc l'oxidació, possiblement degut a un empitjorament de la transferència electrònica⁵ entre l'elèctrode i el mediador adsorbit, que es postula en base a la formació d'espècies intermèdies.

4.3.4.2 Avaluació de la resposta a NADH

A la Taula 4.8 es troben indicats els paràmetres de calibració que corresponen a la realització de corbes de calibració consecutives per a la determinació de NADH, quan s'empren com a elèctrode de treball diferents compòsits amb mediador adsorbit a la seva superfície (vegeu Figura 4.12).

En base a la comparació dels ordres de magnitud dels pendents de les corbes de calibració obtingudes per als compòsits amb mediador a l'interior, s'observa que quan el mediador està adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode la sensibilitat és menor, fet que sembla ésser lògic, atès que en aquest darrer cas hi ha menys interacció entre el mediador i la part conductora de l'elèctrode.

D'altra banda, l'elevada dispersió que presenten les mesures preses per a la majoria dels mediadors avaluats, especialment per MB, DCPIP i 3,4-DHB, s'atribueix a una possible desorció del mediador, la qual cosa contribuiria a agreujar les pèrdues de senyal entre calibratges consecutius.

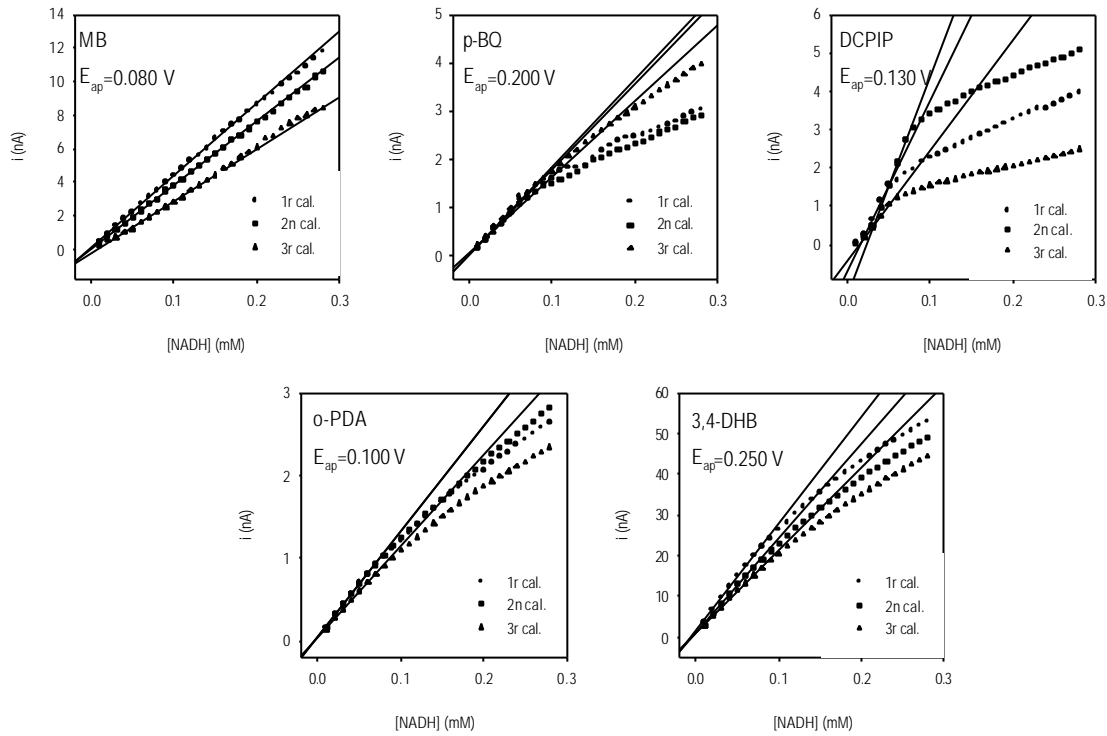


Figura 4.12: Estudi de la reproductibilitat de l'oxidació de NADH, quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb mediador adsorbit a la seva superfície. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $1.0 \cdot 10^{-5}$ M a $2.8 \cdot 10^{-4}$ M. A cada gràfic s'indica el mediador emprat i el potencial de treball.

Taula 4.8: Paràmetres de calibració de les corbes de calibració que es mostren a la Figura 4.12, obtingudes quan s'empra un compost de grafit-epoxi amb mediador adsorbit a la seva superfície com a elèctrode de treball. L'interval lineal s'ha avaluat fins a una concentració de NADH igual a 0.28 mM. Tots els càlculs s'han fet per a $n=3$.

| MEDIADOR ADSORBIT | E_{ap} (V) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ ($\mu A/M$) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) | INTERVAL LINEAL (mM) |
|-------------------|--------------|---|--------------------------|----------------------------|----------------------|
| MB | 0.080 | 37 | 0.9990 a 0.9999 | 16 | 0.009 - 0.28 |
| p-BQ | 0.200 | 17 | 0.9875 a 0.9986 | 8 | 0.01 - 0.09 |
| DCPIP | 0.130 | 43 | 0.9983 a 0.9990 | 32 | 0.02 - 0.07 |
| o-PDA | 0.100 | 12 | 0.9978 a 0.9988 | 8 | 0.01 - 0.07 |
| 3,4-DHB | 0.250 | 233 | 0.9985 a 0.9991 | 13 | 0.008 - 0.01 |

4.3.5 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ADSORBIT EN MEMBRANES DE NAFIÓ DIPOSITADES SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA

4.3.5.1 Preparació de les membranes de Nafió amb mediador adsorbit

La formació de les membranes de Nafió s'observa clarament degut al gruix que aquestes presenten. Mentre que les capes de Nafió sense mediador són incolores i destaquen per la lluentor que proporcionen al compost de grafit-epoxi, les que incorporen mediadors acolorits adquireixen la coloració d'aquests compostos, de manera que per simple inspecció visual es pot confirmar la retenció del mediador a la membrana de Nafió.

4.3.5.2 Caracterització electroquímica

La Taula 4.9 inclou els potencials òptims de treball quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi cobert amb una membrana de Nafió que conté adsorbit el mediador. Aquests potencials s'han deduït de la comparació dels voltamperogrames cíclics mostrats a la Figura 4.13, obtinguts amb aquests composts com a elèctrode de treball, en absència i en presència de NADH.

Taula 4.9: Potencials òptims d'oxidació de NADH extrets dels voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empren, com a elèctrode de treball, composts de grafit-epoxi amb una membrana de Nafió que conté adsorbit cadascun dels diferents mediadors avaluats.

| MEDIADOR ADSORBIT EN MEMBRANES DE NAFIÓ | E_{pa} (V) |
|--|--------------|
| MB | -0.150 |
| p-BQ | 0.100 |
| DCPIP | 0.100 |
| o-PDA | 0.300 |
| 3,4-DHB | 0.250 |

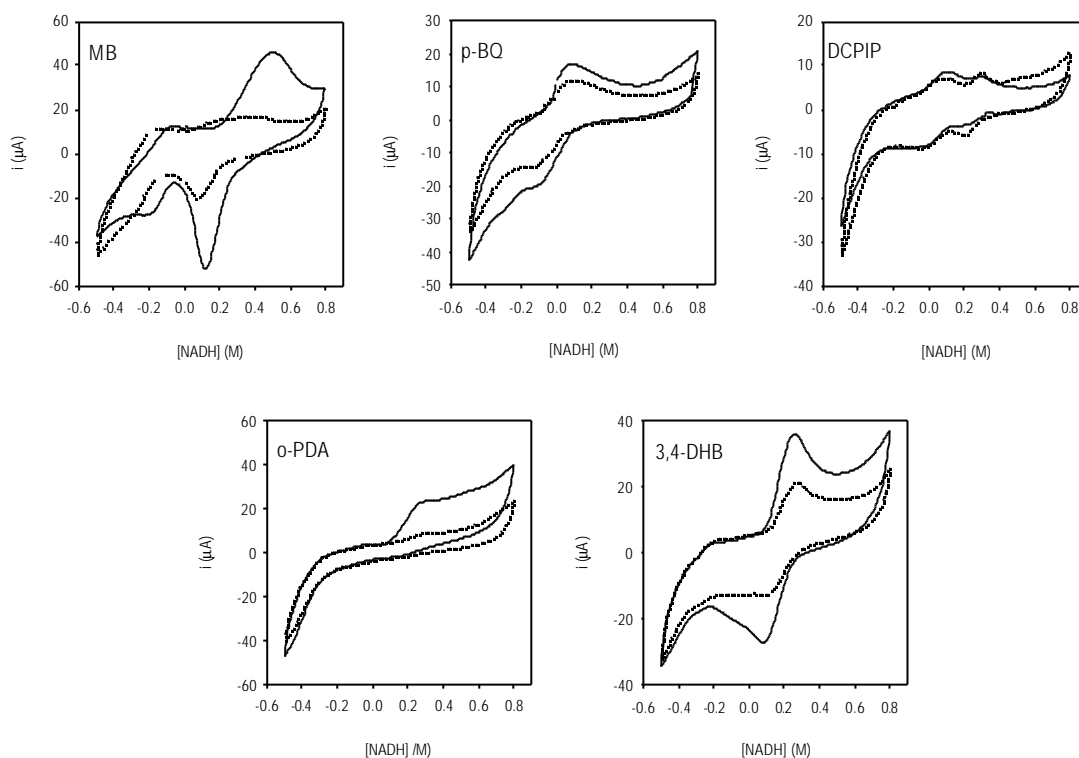


Figura 4.13: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode indicador un compost de grafit-epoxi cobert amb una membrana de Nafió que incorpora adsorbit cadascun dels mediadors estudiats. A tots els gràfics la línia de punts correspon a l'electròlit suport, mentre que el voltamperograma representat per una línia contínua correspon a una solució de NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

4.3.5.3 Avaluació de la resposta a NADH

Només els elèctrodes preparats amb els mediadors MB i 3,4-DHB, adsorbits a la membrana de Nafió que cobreix la superfície electròdica, han permès dur a terme corbes de calibració successives per a NADH, que demostren que hi ha una pèrdua de mediador molt important per dissolució. Aquesta afirmació es fonamenta en el fet que la presència de membranes de Nafió proporciona una bona prevenció envers la passivació,⁵¹ de manera que aquest fenomen queda exclòs com a causant de la pèrdua de sensibilitat progressiva. La Figura 4.14 mostra aquesta disminució de la sensibilitat, alhora que s'observa una millora important en els valors d'aquesta respecte als obtinguts amb composts amb el mediador adsorbit a la seva superfície. Per tant, es demostra que les membranes de Nafió permeten una adsorció del mediador més adequada que la que ofereix la superfície dels composts de grafit-epoxi, per bé que la retenció del mediador no és suficientment forta i és probable que s'acabi perdent fàcilment per dissolució.

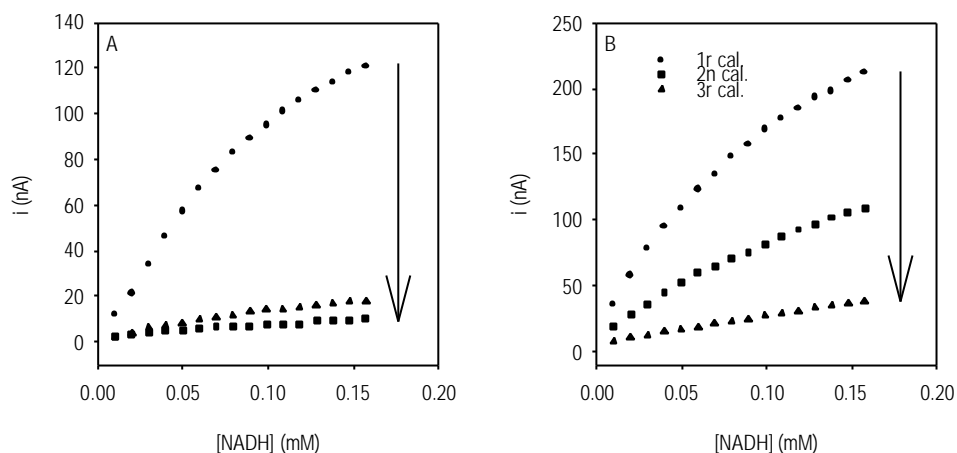


Figura 4.14: Corbes de calibració consecutives per a NADH quan s'empra com a electrode de treball un compost de grafit-epoxi cobert amb una membrana de Nafion que conté adsorbit (A) MB i (B) 3,4-DHB. L'interval de concentracions de NADH avaluat va de $1.0 \cdot 10^{-5}$ M a $1.6 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball ha estat (A) -0.15 V i (B) 0.25 V, respectivament.

4.3.6 QUIMIOSENSORS BASATS EN COMPÒSITS AMB MEDIADOR ELECTROPOLIMERITZAT SOBRE LA SUPERFÍCIE SENSORA

4.3.6.1 Electropolimerització del mediador

Com a resultat de l'aplicació de la metodologia seguida a fi d'electropolimeritzar cadascun dels mediadors avaluats, visualment no s'observa cap pel·lícula polimèrica dipositada sobre la superfície dels compòsits.

4.3.6.2 Caracterització electroquímica i optimització del procés d'electropolimerització

L'etapa inicial de l'estratègia d'optimització a seguir per al procés d'electropolimerització ha permès fixar el tractament electroquímic òptim a aplicar a fi d'obtenir els mediadors electropolimeritzats sobre la superfície dels compòsits. Amb aquest objectiu s'han representat a la Figura 4.15 les corbes de calibració obtingudes per a cadascun dels tractaments electroquímics aplicats, atès que l'elecció d'un determinat tractament es fonamenta en l'avaluació dels pendents, essent l'òptim aquell que proporciona una major sensibilitat.

Tal com s'observa en aquesta Figura, l'aplicació d'un potencial constant durant un determinat interval de temps ha estat el tractament electroquímic que ha conduït a l'obtenció dels quimiosensors que ofereixen una millor resposta enfront a NADH.

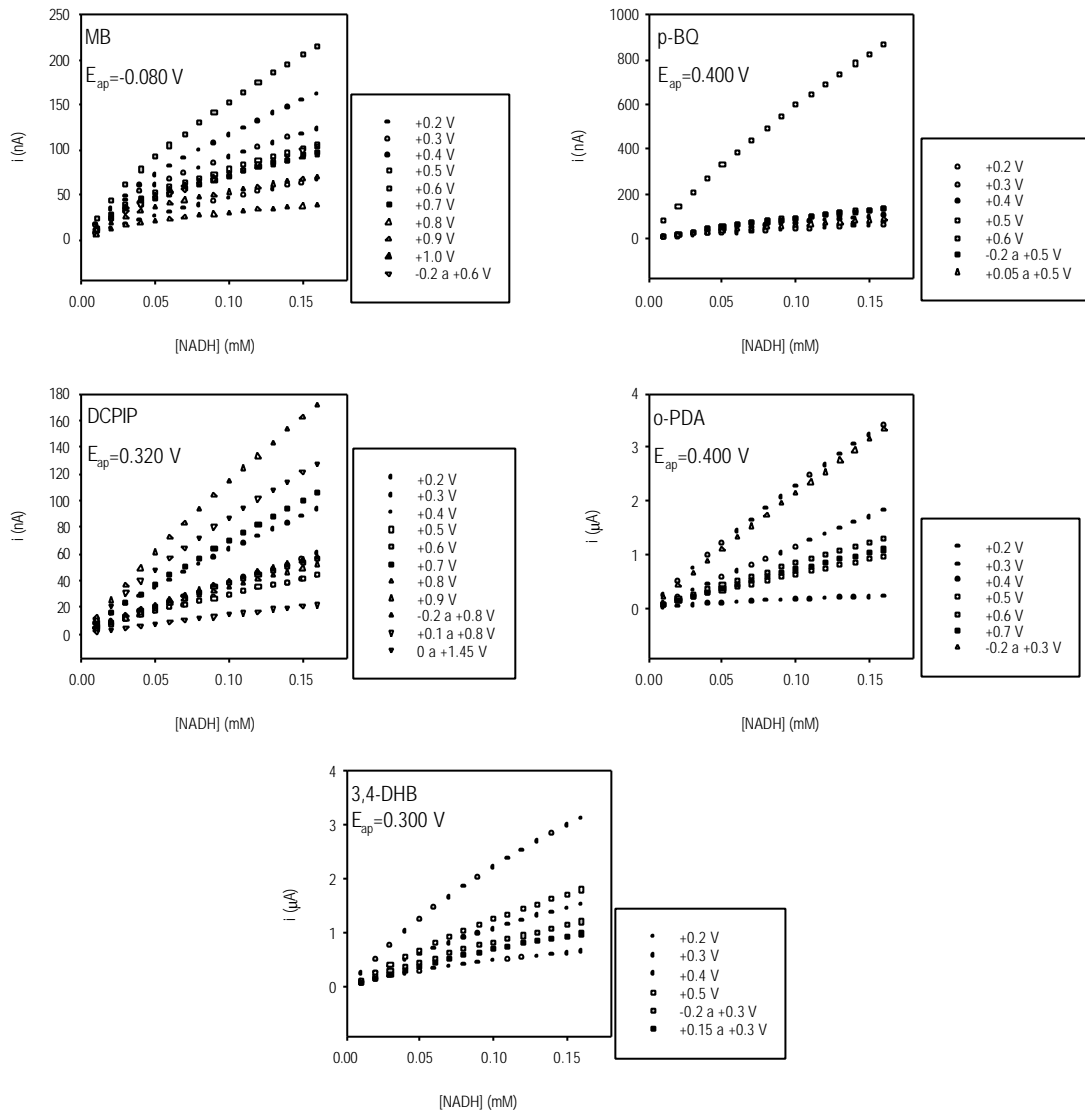


Figura 4.15: Optimització del tractament electroquímic aplicat per dur a terme l'electropolimerització de cadascun dels mediadors en estudi, presents en solucions de concentració 5 mM, sobre la superfície d'un compost de grafit-epoxi. El tractament electroquímic realitzat ha consistit en l'aplicació d'un potencial constant, o bé en cicles de potencial successius entre uns valors fixats, durant un període de 6 minuts. A cada gràfic s'indica el mediador electropolimeritzat, els tractaments electroquímics assajats i el potencial aplicat per determinar l'oxidació de NADH.

D'altra banda, de l'avaluació dels pendents de les corbes de calibració que corresponen als elèctrodes preparats amb el tractament electroquímic optimitzat, per a diferents concentracions de solució de

mediador (1, 5 i 10 mM) i diferents temps d'electropolimerització (3, 6 i 12 minuts), s'han obtingut les condicions òptimes d'electropolimerització, recollides a la Taula 4.10.

Per a cada un dels elèctrodes preparats s'ha enregistrat un voltamperograma a fi de saber si hi ha hagut electropolimerització i, en cas d'ésser així, poder conèixer el potencial de treball a aplicar. No obstant això, a la Figura 4.16 només s'adjunten els voltamperogrames obtinguts quan s'empra com a elèctrode de treball cadascun dels compòsits preparats amb les condicions d'electropolimerització optimitzades.

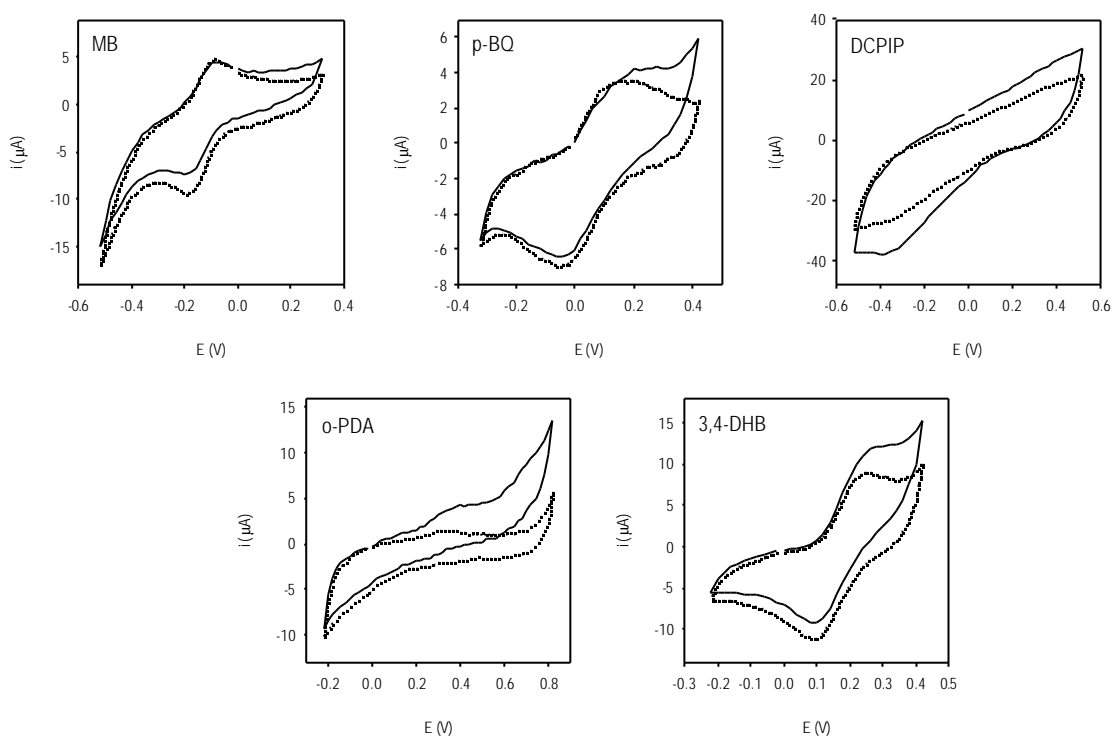


Figura 4.16: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode indicador un compost de grafit-epoxi amb cada un dels mediadors estudiats electropolimeritzat sobre la seva superfície. A tots els gràfics la línia de punts correspon a l'electròlit suport, mentre que el voltamperograma representat per una línia contínua correspon a una solució de $\text{NADH } 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Els voltamperogrames representats a la Figura 4.16, juntament amb els pendents de les corbes de calibració més pronunciats obtinguts en relació als corresponents quan el mediador està adsorbit sobre la superfície de l'elèctrode, semblen confirmar l'eficiència dels processos d'electropolimerització duts a terme.

Finalment, la Taula 4.10 recull les condicions òptimes per al procés d'electropolimerització de cadascun dels mediadors estudiats.

Taula 4.10: Paràmetres optimitzats per al procés d'electropolimerització de diversos mediadors sobre la superfície de composts de grafit-epoxi.

| MEDIADOR | CONDICIONS ÒPTIMES PER AL PROCÉS D'ELECTROPOLIMERITZACIÓ | | |
|----------|--|-------------------------------|--------------------------------------|
| | POTENCIAL D'ELECTRO-POLIMERITZACIÓ (V) | CONCENTRACIÓ DE MEDIADOR (mM) | TEMPS D'ELECTRO-POLIMERITZACIÓ (min) |
| MB | 0.600 | 5 | 6 |
| p-BQ | 0.500 | 10 | 6 |
| DCPIP | 0.800 | 5 | 6 |
| o-PDA | 0.300 | 10 | 3 |
| 3,4-DHB | 0.300 | 1 | 12 |

4.3.6.3 Avaluació de la resposta a NADH

L'avaluació dels paràmetres de calibració obtinguts per a les corbes de calibració successives, mostrades a la Figura 4.17, per a cada un dels composts amb mediador electropolimeritzat a la seva superfície, segons les condicions prèviament optimitzades, permet afirmar que aquesta estratègia de treball, adreçada a incorporar els mediadors al sistema de detecció de NADH, en general dona bons resultats. La pèrdua de senyal per a alguns dels mediadors estudiats (DCPIP i o-PDA) és pràcticament nul·la i, alhora, s'assoleix una bona sensibilitat, especialment amb l'o-PDA (vegeu Taula 4.11).

Taula 4.11: Paràmetres associats a les corbes de calibració que es mostren a la Figura 4.17 quan s'empra per a cada cas un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi amb mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície. Es considera $n=3$ per a tots els casos, excepte per als mediadors DCPIP i o-PDA, per als quals s'ha emprat $n=4$.

| MEDIADOR ELECTROP. | E_{ap} (V) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (mA/M) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) |
|--------------------|--------------|--|--------------------------|----------------------------|
| MB | -0.100 | 0.5 | 0.9874 a 0.9965 | 12 |
| p-BQ | 0.325 | 5 | 0.9995 a 0.9997 | 16 |
| DCPIP | 0.320 | 1 | 0.9998 a 0.9999 | 2 |
| o-PDA | 0.650 | 21 | 0.9999 | 0.6 |
| 3,4-DHB | 0.220 | 27 | 0.9994 a 0.9999 | 7 |

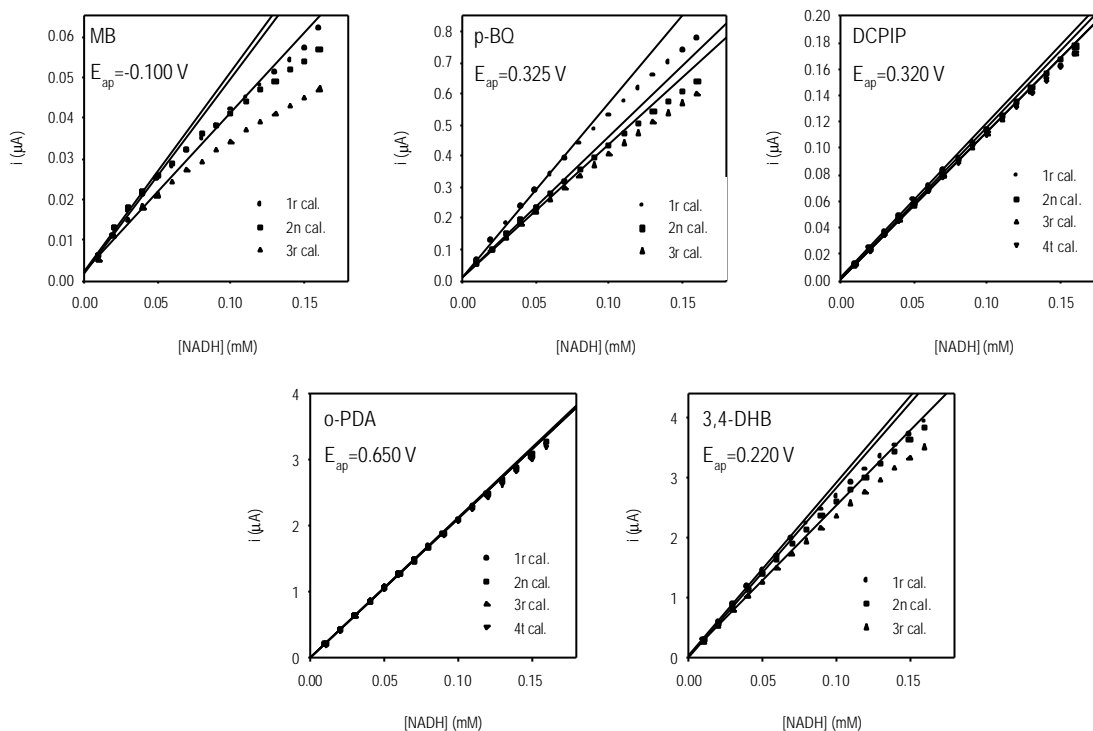


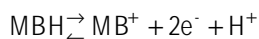
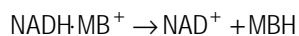
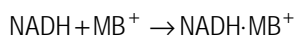
Figura 4.17: Estudi de la reproductibilitat de les mesures d'oxidació de NADH, quan s'usa com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi amb el mediador electropolimeritzat sobre la seva superfície. A cada gràfic s'indica el mediador electropolimeritzat sobre la superfície del compost i el potencial de treball.

4.3.7 JUSTIFICACIÓ DEL COMPORTAMENT DELS MEDIADORS ESTUDIATS

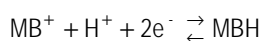
Com ja es va veure a § 4.3.1.1, l'ús de mediadors que experimenten processos electroquímics complexos, que impliquen més d'un electró, sembla afavorir la transferència electrònica amb el NADH, atès que aquest s'oxida mitjançant un procés de diverses etapes en què cedeix 2 electrons i un protó.

És per aquest motiu que els mecanismes de reacció proposats a la bibliografia, per a alguns dels mediadors estudiats, en funció del pH de la solució de treball i, per tant, de l'espècie predominant en què es troben, poden representar un ajut valuós a l'hora d'intentar justificar el comportament observat quan s'empren en l'oxidació de NADH.

Així, per exemple, *Gorton et al.*^{52,53} proposen el següent mecanisme per a la reacció que té lloc entre el MB i el NADH,

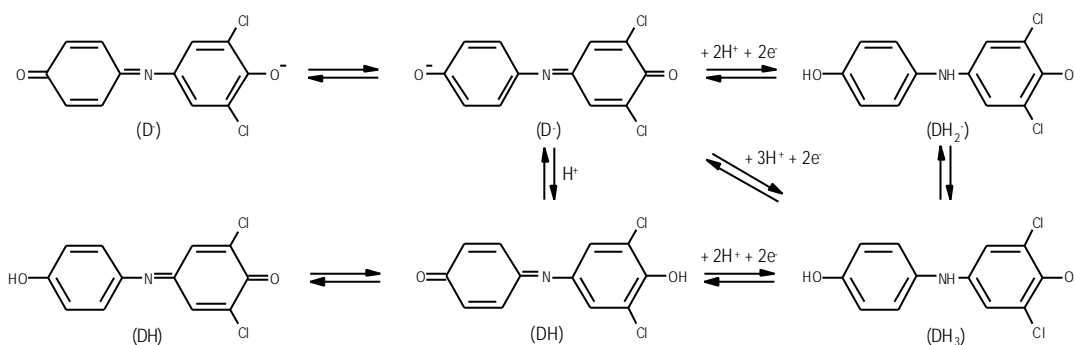


on $\text{NADH} \cdot \text{MB}^+$ és el complex cofactor-mediador format que evoluciona per donar NAD^+ i MBH . El MBH reacciona ràpidament sobre la superfície de l'elèctrode a fi de regenerar-se a través de la seva oxidació. Ara bé, per a valors de pH superiors a 5 el mediador experimenta el següent equilibri:

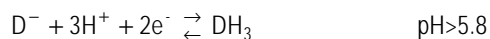


Atès que el pH de la solució de treball emprada ha estat 6.5, això pot haver dificultat la reacció amb el NADH , degut a l'elevada proporció de mediador com a MBH , fet que justificaria els problemes observats en l'obtenció de corbes de calibració per a l'oxidació de NADH quan s'usa el MB en solució.

En el cas del mediador DCPIP es pot intentar justificar els resultats obtinguts en base als equilibris que presenten les diferents espècies¹⁵ en què es pot trobar,



Així, al pH de la solució de treball emprada (pH 6.5) el DCPIP manté el següent equilibri,

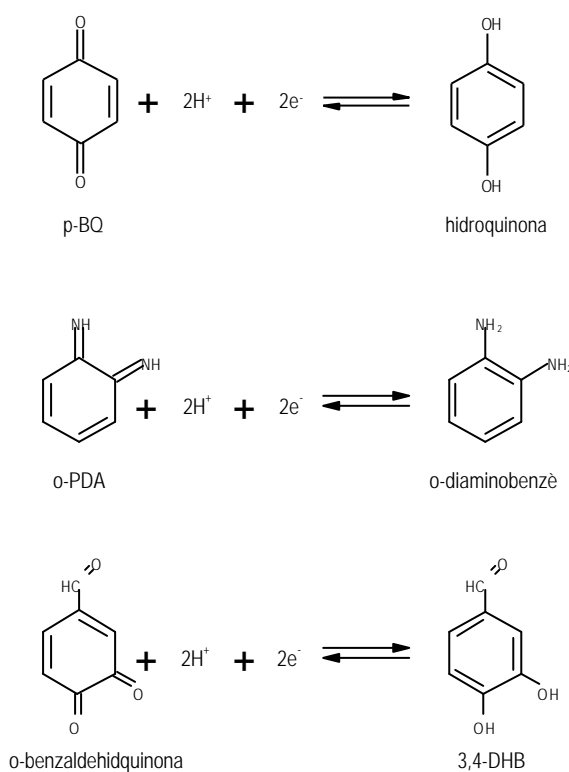


Atès que DH_3 correspon a l'espècie reduïda, com més desplaçat cap a la dreta es trobi l'equilibri anterior, menys s'afavorirà la reacció de transferència electrònica entre el mediador i el NADH . Ara bé, l'ús acceptable d'aquest mediador quan s'incorpora al sistema de detecció en solució o

electropolimeritzat, possiblement és degut a la proporció de mediador que resta com a (D-) al pH de la solució de treball.

Per a la resta de mediadors no s'ha trobat informació adient sobre els mecanismes de la reacció amb NADH. Si bé tots ells, p-BQ,^{54,55} o-PDA¹¹ i 3,4-DHB,⁵⁶ experimenten processos redox en què intervenen 2 electrons i 2 protons, susceptibles d'acoblar-se satisfactòriament amb la reacció d'oxidació de NADH, els resultats obtinguts no permeten donar una justificació clara de com ha transcorregut la reacció.

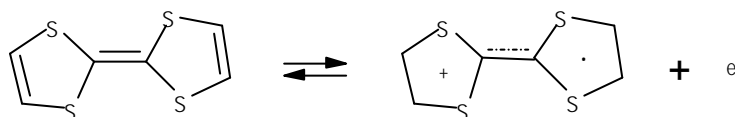
Com a resum, s'extreu que mentre la p-BQ ha donat bons resultats per a l'oxidació de NADH quan s'usa en solució, a l'igual que el 3,4-DHB, el mediador o-PDA mostra un bon comportament quan s'incorpora al sistema de detecció de NADH, adsorbit o electropolimeritzat sobre la superfície de l'elèctrode.



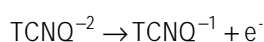
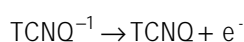
Per últim, per les seves propietats químiques, la sal conductora TTF-TCNQ només s'ha emprat incorporada als compòsits de grafit-epoxi. Els resultats obtinguts demostren la seva capacitat per a actuar com a donador i acceptor d'electrons, gràcies a la presència dels quatre grups *ciano* del TCNQ i a l'estesa conjugació del sistema d'electrons π . Si bé el mecanisme de transferència electrònica entre TTF-TCNQ i la superfície electròdica no està del tot resolt⁵⁷, actualment s'accepta el postulat que

proposa la dissolució de petites quantitats de TTF-TCNQ que aleshores poden acceptar o cedir electrons de manera homogènia.⁵⁸

La reacció electroquímica del TTF s'ha descrit^{59,60} com:



I la del TCNQ com:



Per tant, es creu que el complex de transferència electrònica estable que actua com a mediador resulta de la transferència parcial d'electrons del donador TCNQ cap a l'acceptor TTF, útil per a mediatitzar les reaccions electroquímiques del parell NAD^+/NADH ⁶¹. El caràcter hidrofòbic d'aquest compost i la poca tendència a ionitzar-se, fan pensar en una bona retenció del compost a l'interior del compòsit, que permet una situació estacionària en què es forma una capa de difusió de molt poc gruix en íntim contacte amb la superfície electròdica. Ara bé, la poca estabilitat de les espècies iòniques que es puguin formar,⁶² fa necessària una renovació continua del mediador que passa per una obligada dissolució progressiva de la sal cap a la solució.

4.4 CONCLUSIONS

Del present capítol es poden extreure les següents conclusions:

1 Cap dels mediadors estudiats mostra una millora eficient del procés de reducció de NAD^+ a NADH en relació a quan es duu a terme en absència de mediador. Per tant, resulta inviable treballar amb un sistema de detecció basat en la reducció de NAD^+ .

2 La incorporació de mediadors redox al sistema de detecció redueix, en tots els casos avaluats, el sobrepotencial altrament necessari quan s'efectua l'oxidació electroquímica directa de NADH sobre la superfície de l'elèctrode, mitjançant un procés d'electrocatalisi que permet fer el seguiment de la reacció als potencials característics dels mediadors. Aquesta disminució del potencial de treball millora la transferència electrònica alhora que afavoreix una major selectivitat, atès que evita la detecció d'espècies que són susceptibles d'ésser oxidades al potencial requerit en absència de mediadors.

3 La possibilitat de treballar amb l'aplicació de potencials d'oxidació més baixos, implícita en l'ús de mediadors, aporta una important millora vers la passivació de l'electrode, atès que gairebé per a tots els mediadors assajats el potencial òptim de treball queda per sota del potencial que afavoreix l'adsorció de molècules de NAD^+ sobre la superfície del transductor. A més, atès que l'oxidació del NADH té lloc en solució, les molècules de NAD^+ es formen al si d'aquesta solució, fet que limita el seu contacte directe amb la superfície electròdica i, per tant, la possible passivació que aquest generaria.

4 L'únic mediador inorgànic assajat, el ferricianur, presenta una elevada solubilitat en medi aquós, que dificulta la seva incorporació al sistema de detecció. Com a conseqüència, aquesta espècie únicament pot utilitzar-se com a mediador quan s'afegeix solubilitzada al medi de reacció. L'ús del ferricianur en solució redueix el potencial de treball i minimitza els problemes de passivació de la superfície, si bé aquesta no és la metodologia més còmoda a fi d'incorporar un mediador al sistema.

5 Entre els mediadors orgànics avaluats, la sal conductora TTF-TCNQ només s'ha assajat incorporada als compòsits de grafit-epoxi, degut a les seves propietats físiques com és l'elevada insolubilitat dels seus cristalls. La transferència d'electrons entre les dues espècies que formen la sal li permet el seu paper com a electrocatalitzador de la reacció d'oxidació del NADH , fet que es reflexa en la millor sensibilitat obtinguda per a tots els compòsits preparats amb mediador incorporat al seu interior. No obstant això, el potencial de treball aplicat, així com la poca estabilitat de les espècies que es formen a la capa de difusió adjacent a la superfície electròdica que obliga a una renovació continuada del mediador, es reflecteixen en la disminució progressiva de la sensibilitat per a corbes de calibració successives.

6 Malgrat les nombroses referències bibliogràfiques que fan esment de la utilitat del MB com a mediador eficaç en el procés d'oxidació de NADH , els resultats obtinguts de la incorporació, per diferents vies, d'aquest mediador al sistema quan s'empra un electrode de treball basat en un compòsit de grafit-epoxi, no han resultat ésser gaire prometedors. Pel que fa als compòsits amb MB al seu interior, han mostrat pèrdues del mediador, si bé els compòsits amb un 7 % de mediador i recoberts amb una membrana protectora de Nafíó, i especialment els compòsits preparats mitjançant la incorporació d'un 12 % del producte resultant de la reacció entre el mediador i la sal de Reinecke, ofereixen una millora important, atès que semblen evitar-ne parcialment la pèrdua per solubilització, tot i que no aconsegueixen mantenir estable la seva superfície. D'altra banda, s'ha comprovat que ni el seu ús en solució, ni l'adsorció, ja sigui directa sobre el compòsit o sobre una membrana de Nafíó, ni l'electropolimerització del MB sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi, solucionen els problemes de passivació.

7 Malgrat que no s'han aconseguit compòsits estables amb p-BQ retinguda a l'interior, ni amb el mediador adsorbit sobre una membrana de Nafíó, l'ús d'aquest mediador en solució redueix notablement els problemes de passivació. Tampoc han millorat les pèrdues de sensibilitat entre corbes de calibració successives quan s'adsorbeix o s'electropolimeritza el mediador sobre la superfície electròdica.

8 Els resultats obtinguts per al mediador DCPIP mostren un ús acceptable quan s'incorpora en solució i, especialment electropolimeritzat, al sistema de detecció, mentre que la seva adsorció sobre la superfície de l'elèctrode, així com sobre una membrana de Nafíó, esdevé inviable. La seva incorporació dins dels compòsits de grafit-epoxi obliga a treballar a un potencial excessivament elevat que possiblement permet l'oxidació directa del NADH sobre la superfície electròdica i, per tant, contribueix a la passivació que agreuja les pèrdues de sensibilitat degudes a la pròpia dissolució del mediador des de l'interior del compòsit cap a la solució.

9 Els resultats obtinguts quan s'empra o-PDA en solució, mostren la incapacitat d'aquest sistema per a resoldre els problemes de passivació. S'ha comprovat la impossibilitat de treballar amb compòsits basats en o-PDA-grafit, degut a l'elevada inestabilitat que presenta el sistema causada per la dissolució del mediador que acaba sortint del compòsit. Tampoc s'ha aconseguit un compòsit estable recobert amb una membrana de Nafíó i o-PDA adsorbit en ella. Malgrat això, els resultats obtinguts quan el mediador s'adsorbeix o s'electropolimeritza sobre la superfície del transductor, demostren l'absència de passivació. L'electropolimerització esdevé especialment valuosa atès que proporciona un augment de sensibilitat molt important al sistema si es compara amb els resultats obtinguts quan la immobilització ha tingut lloc per adsorció. El temps d'electropolimerització optimitzat (3 min) sembla estar d'acord amb el fet que es forma un polímer no conductor, de manera que la capa polimèrica ha d'ésser molt prima a fi de poder mantenir la conductivitat.

10 El mediador 3,4-DHB mostra una baixa sensibilitat i una pobre reproductibilitat dels pendents per a corbes de calibració successives quan s'incorpora al sistema de detecció en solució. D'altra banda, l'adsorció, ja sigui directa sobre el compòsit o sobre una membrana de Nafíó, i l'electropolimerització de 3,4-DHB sobre la superfície del compòsit, no eviten totalment els problemes associats a la passivació de l'elèctrode. La incorporació de 3,4-DHB a l'interior d'un compòsit redueix el potencial de treball, però aquest lixivia progressivament per dissolució al medi de reacció.

11 La incorporació de mediadors en solució al sistema de detecció de NADH, malgrat que redueix els problemes de passivació de la superfície de l'elèctrode, alhora que proporciona una bona sensibilitat al sistema, esdevé poc recomanable atès que implica haver d'addicionar mediador contínuament al medi de reacció. A més, gairebé tots els mediadors assajats han mostrat temps d'estabilització llargs.

12 L'ús de compòsits amb mediador al seu interior no és viable, encara que hagin curat bé en el seu procés de construcció, ja que es produeixen pèrdues de mediador per dissolució al medi de reacció. No obstant això, el recobriment amb membranes protectores de Nafíó, així com l'ús de la sal de Reinecke que aconsegueix formar compostos parcialment insolubles amb el MB, milloren l'estabilitat dels compòsits. Ara bé, el senyal continua essent petit, degut a la poca quantitat de mediador reactiu a la superfície de l'elèctrode.

13 Si bé l'adsorció de mediadors sobre la superfície de l'elèctrode de treball ha representat una millora important alhora d'evitar els problemes de passivació, especialment quan s'utilitzen els mediadors p-BO

i o-PDA, les sensibilitats i repetitivitats que proporcionen aquests elèctrodes modificats al sistema de detecció representen un inconvenient que cal solucionar.

14 L'adsorció de mediadors sobre membranes de Nafió que cobreixen la superfície electròdica, només és viable en aquells casos en què intervinguin formes catióniques del mediador que puguin interaccionar amb els grups carregats negativament d'aquest polímer aniónic. Aquest és el cas de l'espècie MB⁺ que participa a les reaccions mediatitzades amb MB. De totes formes, els canvis de càrrega que es produeixen durant les reaccions electroquímiques porten a una fàcil desorció del mediador que es veu reflectida en la disminució progressiva dels pendents de les corbes de calibració.

15 L'electropolimerització dels mediadors sobre la superfície dels compòsits, no només representa una estratègia valuosa per dur a terme modificacions químiques degut a que permet obtenir superfícies altament reproduïbles, sinó que a més per als mediadors MB i p-BQ ha permès reduir el potencial de treball respecte a l'obtingut quan es treballa amb aquests mediadors en solució, fet que minimitza significativament la passivació de la superfície dels elèctrodes.

16 L'ús de sistemes de detecció basats en compòsits amb el mediador incorporat a la matriu, adsorbit o electropolimeritzat sobre la superfície de l'elèctrode, en general implica uns potencials òptims de treball més elevats que els corresponents a sistemes que incorporen el mediador en solució, fet que contradiu les referències que apareixen a la bibliografia. Es pot pensar que la limitació en la mobilitat del mediador que suposa la seva immobilització és la causa principal d'aquest fet, i no la pèrdua del mediador per dissolució, ja que aquesta portaria a l'obtenció de potencials òptims semblants als que s'obtenen quan es treballa amb el mediador en solució. De totes formes, es demostra que, per a tots els casos estudiats, s'estableix un contacte elèctric adequat entre les partícules de grafit del compòsit i el mediador immobilitzat, que permet la transferència electrònica entre ambdós, responsable de l'oxidació de NADH a través del mediador.

17 La sensibilitat esdevé més elevada quan el mediador es troba en solució o electropolimeritzat sobre la superfície de l'elèctrode, atès que aquestes estratègies proporcionen una quantitat de mediador disponible per reaccionar amb NADH, més gran que l'obtinguda quan el mediador està adsorbit, formant una única monocapa. Per la seva banda, els compòsits van perdent el mediador que tenen a l'interior, fet que afecta greument a la seva sensibilitat i que, per tant, fa impossible una comparació amb els resultats mesurats per les altres estratègies.

18 Com a resultat d'avaluar tot el que s'ha dit prèviament, es tria com a estratègia d'incorporació del mediador al sistema de detecció l'electropolimerització, entenent que aquesta resol de manera satisfactòria els problemes de passivació de la superfície implicats en la determinació directa de NADH. D'altra banda, la sensibilitat observada a les corbes de calibració obtingudes amb els mediadors electropolimeritzats dirigiria els estudis posteriors cap a l'ús d'o-PDA o de 3,4-DHB, si bé resta encara per avaluar una darrera estratègia d'incorporació de mediadors basada en l'ús de membranes de polisulfona. Per tant, arribats a aquest punt no es pren encara una decisió sobre quina serà la modificació química que s'aplicarà als biosensors que es desenvoluparan.

4.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ K. Kalcher. *Electroanalysis*, **2** (1990) 419-433
- ² W. J. Blaedel, R. A. Jenkins, *Analytical Chemistry*, **47** (1975) 1337-1343
- ³ C. A. Groom, J. H. T. Luong. *Analytical Letters*, **26** (1993) 1383-1390
- ⁴ J. Moiroux, P. J. Elving. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **102** (1979) 93-108
- ⁵ S. A. Wring, J. P. Hart. *Analyst*, **117** (1992) 1215-1229
- ⁶ L. Gorton, E. Csöregi, E. Domínguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson. *Analytica Chimica Acta*, **250** (1991) 203-248
- ⁷ M. Cosgrove, G. J. Moody, J. D. R. Thomas. *Analyst* **113** (1988) 1811-1815
- ⁸ T. Nakaminami, S. Kuwabata, H. Yoneyama. *Analytical Chemistry* **69** (1997) 2367-2372
- ⁹ K. Hirano, H. Yamato, K. Kunimoto, M. Ohwa. *Sensors and Actuators* **B86** (2002) 88-93
- ¹⁰ G. Bremle, B. Persson, L. Gorton. *Electroanalysis*, **3** (1991) 77-86
- ¹¹ K. Ravichandran, R. P. Baldwin. *Analytical Chemistry*, **55** (1983) 1586-1591
- ¹² P. C. Pandey. *Methods in Biotechnology*, **6** (1998) 81-92
- ¹³ E. V. Ivanova, V. S. Sergeeva, J. Oni, C. Kurzawa, A. D. Ryabov, W. Schuhmann. *Bioelectrochemistry* **60** (2003) 65-71
- ¹⁴ P. C. Pandey, S. Upadhyay, B. Upadhyay. *Analytical Biochemistry*, **252** (1997) 136-142
- ¹⁵ A. B. Florou, M. I. Prodromidis, M. I. Karayannis, S. M. Tzouvara-Karayanni. *Electroanalysis*, **10** (1998) 1261-1268
- ¹⁶ V. S. Soukharev, A. D. Ryabov, E. Csöregi. *Journal of Organometallic Chemistry* **668** (2003) 75-81
- ¹⁷ S. Dong, B. Wang, B. Liu. *Biosensors & Bioelectronics*, **7** (1992) 215-222
- ¹⁸ H. Liu, J. Deng. *Journal of Electrochimica Acta*, **40** (1995) 1845-1849
- ¹⁹ M. Vaillancourt, J. W. Chen, G. Fortier, D. Bélanger. *Electroanalysis*, **11** (1999) 23-31
- ²⁰ J. K. Harkness, O. J. Murphy, G. D. Hitchens. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **357** (1993) 261-272
- ²¹ R. S. Brown, J. H. T. Luong. *Analytica Chimica Acta*, **310** (1995) 419-427
- ²² L. Mao, K. Yamamoto. *Talanta*, **51** (2000) 187-195
- ²³ F. Pariente, E. Lorenzo, H. D. Abruña. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 4337-4344
- ²⁴ S. L. Álvarez-Crespo, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. *Biosensors & Bioelectronics*, **12** (1997) 739-747
- ²⁵ A. Vasilescu, T. Noguier, S. Andreescu, C. Calas-Blanchard, C. Bala, J.-L. Marty. *Talanta*, **59** (2003) 751-765
- ²⁶ G. Arai, M. Masuda, I. Yasumori. *Chemistry Letters*, (1992) 1791-1794

- ²⁷ S. Alegret. *Analyst*, **121** (1996) 1751-1758
- ²⁸ X. Llopis. *Biosensors basats en biocompòsits epoxi-grafit-TTF-TCNQ-GOD per a la determinació de glucosa mitjançant un sistema FIA*. Treball de Recerca. Universitat Autònoma de Barcelona (2002) p 21
- ²⁹ X. Llopis, A. Merkoçi, M. del Valle, S. Alegret. *Sensors and Actuators*, **B** (2005) (en premsa)
- ³⁰ A. E. G. Cass (Ed.). *Biosensors. A practical approach*. New York, Oxford University Press (1990) pp 50-51
- ³¹ X. Llopis. *Biosensors basats en biocompòsits epoxi-grafit-TTF-TCNQ-GOD per a la determinació de glucosa mitjançant un sistema FIA*. Treball de Recerca. Universitat Autònoma de Barcelona (2002) p 16
- ³² Q. Xin, R. M. Wightman. *Analytica Chimica Acta*, **341** (1997) 43-51
- ³³ P. Calvo-Marzal, K. Y. Chumbimuni-Torres, N. F. Hoehner, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota. *Sensors and Actuators*, **B100** (2004) 333-340
- ³⁴ B. Gründig, G. Wittstock, U. Rüdell, B. Strehlitz. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **395** (1995) 143-157
- ³⁵ G. Nagy, I. Kapui, L. Gorton. *Analytica Chimica Acta*, **305** (1995) 65-73
- ³⁶ R. Appelqvist, G. Marko-Varga, L. Gorton, A. Torstensson, G. Johansson. *Analytica Chimica Acta*, **169** (1985) 237-247
- ³⁷ C. Y. Chen, E. Tamiya, K. Ishihara, Y. Kosugi, Y. C. Su, N. Nakabayashi, I. Karube. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **36** (1992) 211-226
- ³⁸ C. Y. Chen, M. Gotoh, H. Makino, Y. C. Su, E. Tamiya, I. Karube. *Analytica Chimica Acta*, **265** (1992) 5-14
- ³⁹ T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 2451-2457
- ⁴⁰ R. F. B. Turner, D. J. Harrison, R. V. Rajotte, H. P. Baltes. *Sensors and Actuators*, **B1** (1990) 561-564
- ⁴¹ I. Rubinstein, A. J. Bard. *Journal of the American Chemical Society*, **102** (1980) 6641-6642
- ⁴² I. Rubinstein, A. J. Bard. *Journal of the American Chemical Society*, **103** (1981) 5007-5013
- ⁴³ M. G. Garguilo, A. C. Michael. *Analytica Chimica Acta*, **307** (1995) 291-299
- ⁴⁴ E. N. Navera, M. Suzuki, E. Tamiya, T. Takeuchi, I. Karube. *Electroanalysis*, **5** (1993) 17-22
- ⁴⁵ W. Matuszewski, M. Trojanowicz, A. Lewenstam. *Electroanalysis*, **2** (1990) 607-615
- ⁴⁶ C. Malitesta, F. Palmisano, L. Torsi, P. G. Zamboni. *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 2735-2740
- ⁴⁷ E. A. H. Hall. *Biosensors*, New Jersey, Prentice Hall (1991) pp 251-255
- ⁴⁸ G. F. Khan. *Electroanalysis*, **9** (1997) 325-329
- ⁴⁹ U. Korell, U. E. Spichiger. *Electroanalysis*, **6** (1994) 305-315
- ⁵⁰ P.D. Hale, T. A. Skotheim. *Synthetic Metals*, **28** (1989) C853-C858
- ⁵¹ A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, O. A. Bobrova, L. V. Lukachova, A. K. Gladilin, A. V. Levashov. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 4335-4341
- ⁵² L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **161** (1984) 103-120

- ⁵³ R. Appelqvist, G. Marko-Varge, L. Gorton, A. Torstensson, G. Jöhansson. *Analytica Chimica Acta*, **169** (1985) 237-247
- ⁵⁴ P. Domínguez, P. Tuñón, J. M. Fernández, M. R. Smyth. *Analytical Proceedings*, **26** (1989) 377-390
- ⁵⁵ P. D. Sánchez, P. T. Blanco, J. M. F. Álvarez, M. R. Smyth, R. O'Kennedy. *Electroanalysis*, **2** (1990) 303-308
- ⁵⁶ E. Lorenzo, F. Pariente, L. Hernández, F. Tobalina, M. Darder, Q. Wu, M. Maskus, H. D. Abruña. *Biosensors & Bioelectronics*, **13** (1998) 319-332
- ⁵⁷ W. J. Albery, P. N. Bartlett, B. J. Driscoll, R. B. Lennox. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **323** (1992) 77-102
- ⁵⁸ J. L. Kawagoe, D. E. Niehaus, R. M. Wightman. *Analytical Chemistry*, **63** (1991) 2961-2965
- ⁵⁹ A. P. F. Turner, S. P. Hendry, M. F. Cardosi. *Biosensors: Instrumentation and Processing, The World Biotechnology Report*. London, Online Publications Vol. 1 (Part 3) (1987) p 125
- ⁶⁰ H. Gunasingham, C. Tan. *Electroanalysis*, **1** (1989) 423-429
- ⁶¹ A. Chaubey, B. D. Malhotra. *Biosensors & Bioelectronics*, **17** (2002) 441-456
- ⁶² P. N. Bartlett, S. Booth, D. J. Caruana, J. D. Kilburn, C. Santamaria. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 734-742

5 DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE NADH: ÚS DE MEMBRANES DE POLISULFONA PER A LA INCORPORACIÓ DE DIVERSOS MEDIADORS REDOX AL SISTEMA DE DETECCIÓ

5.1 INTRODUCCIÓ

La demanda cada vegada més exigent de biosensors compactes ha orientat el camp dels biosensors cap a l'estudi de matrius polimèriques que, al mateix temps que serveixen com a matriu per a la incorporació de l'enzim, poden incorporar mediadors redox al seu interior.

Malgrat el gran nombre d'estratègies avaluades per a la incorporació de mediadors redox ¹ (vegeu § 1.3.2), i d'enzims al sistema de detecció (mitjançant polímers redox ^{2,3}, membranes orgàniques electropolimeritzades⁴, capes de polímer i polielectròlit^{5,6}, membranes lipídiques^{7,8,9,10}, proteïnes entrecruades¹¹, gels de sílice¹² i hidrogels^{13,14}, pastes de carboni¹⁵, tintes serigràfiques^{16,17}, etc.), la majoria de biosensors quasi-compactes encara mostren limitacions en la seva estabilitat operacional, com a conseqüència de la pèrdua de mediador i enzim, a més de la possible inestabilitat d'aquest últim quan es troba a un medi diferent al seu medi natural.

Per tot això, un factor molt important a considerar en el desenvolupament de sensors és l'estratègia d'incorporació del mediador a la matriu de la membrana sensora. Aquest és un punt crític per al bon funcionament del sensor, atès que l'activitat de les espècies immobilitzades, i de forma molt important la seva possible pèrdua per dissolució, depenen fortament de la metodologia d'immobilització escollida, així com de l'àrea de la superfície electròdica, i de la porositat i caràcter hidròfil de la matriu emprada per a la immobilització¹⁸.

En aquest context s'estudiarà la *polisulfona* com a un nou material polimèric útil en el desenvolupament de nous sensors amperomètrics. La mescla d'aquest polímer amb grafit li confereix la conductivitat necessària per a poder ésser emprat en una àmplia varietat de noves aplicacions.¹⁹

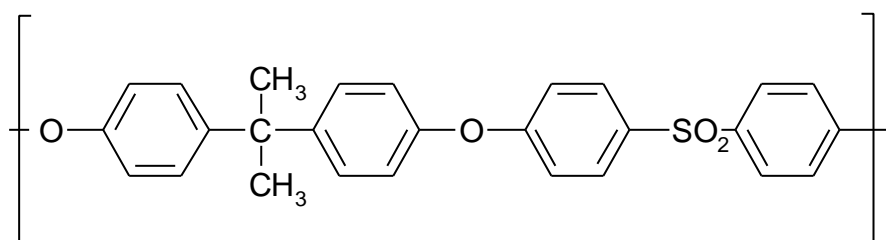


Figura 5.1: Estructura química del polímer de polisulfona.

La polisulfona és un polímer porós que s'ha emprat habitualment com a material suport de membranes basades en compòsits, així com de membranes d'ultrafiltració. El desenvolupament d'aquestes membranes va aparèixer per primer cop a la dècada dels anys 60, amb l'objectiu d'oferir una alternativa a les membranes de cel·lulosa, atès que posseeixen un cert caràcter selectiu que depèn directament de l'estratègia de preparació emprada. Els avantatges aportats pels polímers de polisulfona envers d'altres tipus de membranes es fonamenten en la seva resistència enfront de valors de pH extrems i en la seva estabilitat tèrmica. La polisulfona és soluble en dissolvents com el cloroform i la dimetilformamida i, un cop en solució, les membranes es poden aplicar fàcilment sobre diferents suports mitjançant processos convencionals d'inversió de fases. Si bé l'estabilitat química i tèrmica que presenta la polisulfona, juntament amb l'excel·lent capacitat per formar membranes, mostren aquest polímer com a una bona matriu per ésser emprada en el desenvolupament de sensors amperomètrics, el seu caràcter hidrofòbic pot actuar en determinats casos com a un inconvenient. A més d'evitar la seva hidratació espontània en medi aquós, pot propiciar adsorcions inespecífiques que acabaran passant la superfície electroòica. No obstant això, aquest caràcter hidrofòbic pot ésser modificat mitjançant l'addició al polímer d'altres components que puguin contribuir en l'increment de la hidrofilitat de la membrana. Com a exemple, es pot pensar en afegir alguns mediadors redox típicament hidrofílics. D'aquesta manera s'evitaran adsorcions inespecífiques típiques de materials amb un caràcter fortament hidrofòbic. Ara bé, convé mantenir un cert grau d'hidrofobicitat, puix que aquesta propietat serà responsable d'evitar que es perdin amb relativa facilitat les espècies solubles en aigua retingudes al seu interior. Per tot això, un cop assolit el grau d'hidratació desitjat de la membrana, és aconsellable evitar que s'assequi completament i, en tot cas, si és necessari assecar-la, esdevé adequat tractar-la amb algun agent hidrofòbic, com per exemple glicerina.

Com a resultat de totes les característiques pròpies d'aquest polímer, la polisulfona es presenta com un material estructural molt atractiu per a ésser emprat en el desenvolupament de nous sensors. Aquests polímers amplien les possibilitats de modificar la superfície d'electrodes convencionals, gràcies a que es poden emprar en el disseny de sensors químics i biosensors, conferint-los les noves i interessants propietats que els caracteritzen.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 APARELLS I REACTIUS

5.2.1.1 Aparells

A fi de realitzar mesures de tipus voltamperomètric i amperomètric, s'han utilitzat els aparells descrits a § 2.2.1.1. Les mesures d'impedància s'han dut a terme amb un instrument Zahner, model IM6e. Tots

els experiments s'han efectuat a temperatura ambient (25°C) amb un sistema convencional de tres elèctrodes, en què l'elèctrode de treball ha estat un compost de grafit-epoxi modificat amb diferents membranes de polisulfona. Els elèctrodes de referència i auxiliar són els usats anteriorment. Com a pas previ a la preparació dels quimiosensors, s'ha realitzat el poliment físic dels composts de grafit-epoxi descrit a § 2.2.3.1.

Tanmateix, s'ha estudiat la morfologia de les membranes de polisulfona mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat. S'ha emprat un microscopi electrònic d'escombrat Hitachi S-570 (Hitachi Ltd. Tokyo, Japan) per a l'observació i enregistrament de les imatges de la superfície i de la secció transversal de les membranes de polisulfona. El voltatge d'acceleració aplicat ha estat de 15 KV. El recobriments amb una monocapa d'or de les membranes sense fractura, i de les fracturades després d'haver estat congelades en nitrogen líquid, s'ha dut a terme en una cambra de buit a baixa pressió mitjançant *RF-sputtering*. Un cop preparades les mostres s'han fixat amb l'ús de cinta adhesiva a unes plataformes que permeten la seva col·locació a l'espai interior del microscopi disposat per a la mostra.

Per últim, també s'ha estudiat l'estructura de les membranes de polisulfona mitjançant la seva anàlisi per espectroscòpia d'infraroig. Prèviament a aquest estudi, les membranes s'han assecat a temperatura ambient, protegides de la humitat a un ambient sec, durant un dia. Els espectres IR han estat enregistrats a temperatura ambient amb un espectròmetre Bruker, model Tensor-27, amb un accessori tipus ATR (Attenuated Total Reflectance).

5.2.1.2 Reactius

Per a la preparació dels composts de grafit-epoxi s'han utilitzat els mateixos reactius que a § 2.2.1.2.

La polisulfona ha estat subministrada per la firma comercial BASF (BASF583 3120). La N,N-dimetilformamida (DMF) s'ha comprat a la casa Aldrich. El NADH i els mediadors són els mateixos emprats en els capítols precedents.

La resta de reactius usats són de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

5.2.2 VALIDACIÓ DE LES MEMBRANES BASEDES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA COM A NOUS MATERIALS TRANSDUCTORS PER AL DESENVOLUPAMENT DE SENSORS ELECTROQUÍMICS

Atès que el polímer de polisulfona mai s'havia emprat anteriorment com a matriu amb aplicacions al camp dels sensors químics, el primer pas a dur a terme ha estat avaluar la capacitat d'aquest material per a ésser utilitzat com a superfície electròdica. Aquest objectiu s'ha acomplert amb la preparació de membranes de polisulfona adreçades a cobrir la superfície dels elèctrodes de grafit-epoxi usats com a suport físic conductor. Les característiques d'aquestes membranes, especialment referents a les

propietats electroquímiques que poden oferir, han estat objecte d'un estudi detallat dirigit a validar l'ús de la polisulfona com a matriu polimèrica, per a la incorporació de diferents modificadors, en el disseny de sensors químics. Inicialment s'han preparat elèctrodes amb membranes de polisulfona sense cap component addicional, que han portat a l'obtenció d'intensitats de corrent degudes al caràcter porós d'aquests materials, que permet la difusió de les espècies a detectar fins a la superfície del compost de grafit-epoxi. Aquests resultats clarament difereixen dels que s'obtidrien si es tractés d'un material conductor, que permetria l'existència de processos de transferència electrònica. Com a conseqüència, els estudis posteriors s'han efectuat amb membranes basades en compòsits de polisulfona amb grafit, atès que aquest darrer proporciona el caràcter elèctricament conductor adient per a materials destinats a la preparació de sensors electroquímics.

5.2.2.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona

S'han preparat solucions de polisulfona al 7.5 % en pes, mitjançant la dissolució de 0.1675 g de partícules sòlides de polisulfona en 2 ml de dimetilformamida anhidra. La protecció en tot moment de la humitat ambiental esdevé un punt crític en la preparació d'aquestes membranes, atès que la presència d'un ambient humit és suficient com per què precipiti la polisulfona. Per aquest motiu, durant la dissolució de les partícules sòlides inicials de polisulfona, així com durant el seu emmagatzematge un cop preparada la solució, cal segellar adientment els recipients on es troben contingudes. Quan es tracta de la preparació de compòsits de grafit-polisulfona, cal afegir a la solució inicial de polisulfona un 16.5 % en pes de grafit. Aquest percentatge de grafit es va escollir com a òptim puix que permet una bona formació de les membranes, alhora que és suficient per assegurar una adequada conductivitat. Quantitats més elevades de grafit poden provocar l'aparició d'esquerdes com a conseqüència del trencament de l'estructura porosa de la polisulfona.

Un cop preparada la solució de polisulfona o el compòsit de grafit-polisulfona, i amb l'ajut d'un corró de gravat, s'aplica una membrana de poc gruix sobre la superfície d'elèctrodes basats en compòsits de grafit-epoxi. Tot seguit, es duu a terme el procés d'inversió de fases, que es fonamenta en submergir la superfície electròdica, prèviament coberta amb la membrana, en aigua bidestil·lada freda (aproximadament a 4°C) durant uns minuts. En aquest cas la inversió de fases es realitza mitjançant una immersió amb precipitació²⁰, que ha de ser molt ràpida, per evitar que la humitat ambiental sigui responsable de l'inici de la precipitació, fet que pot afectar de manera important a la reproductibilitat associada a la preparació. Aquest procés permet la transformació de forma controlada d'un polímer en solució a la seva forma sòlida. Quan es submergeix la polisulfona en aigua, la pròpia polisulfona precipita, mentre que la DMF surt del sòlid que s'està formant i és bescanviada per l'aigua que l'envolta. Per tant, esdevé palès que el control acurat de les diferents etapes d'aquest procés de transició de fases permet modular en gran mesura la morfologia de la membrana que s'està formant, fet que possibilita el control de paràmetres com la porositat o el gruix de la membrana. Com a darrer pas, els elèctrodes coberts amb membranes de polisulfona són rentats amb abundant aigua bidestil·lada per eliminar possibles restes de DMF.

5.2.2.2 Caracterització electroquímica

S'ha fet ús de la voltamperometria cíclica a fi de poder determinar el potencial òptim de treball per a l'oxidació de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ quan s'empra un compòsit de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona, amb o sense grafit.

S'omple la cel·la electroquímica amb tampó fosfat 0.05 i KCl 0.05 M a pH 5.0 i s'enregistren els voltamperogrames cíclics obtinguts quan es duu a terme un cicle de potencial entre 0.5 i -0.3 V, en absència i en presència de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ 0.076 mM, amb un elèctrode basat en un compòsit de grafit-epoxi cobert amb una membrana de polisulfona, emprat com a elèctrode de treball. Es repeteix el mateix procediment però per a un elèctrode preparat amb una membrana de polisulfona amb grafit.

5.2.2.3 Avaluació de la resposta a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$

Amb l'objectiu d'avaluar la sensibilitat i la variació entre corbes de calibració successives per a elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona, amb o sense grafit, com a indicatiu de la possible passivació de la superfície electròdica, s'han realitzat mesures amperomètriques corresponents a l'addició de petits volums d'una solució 1.6 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ a 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 5.0. El potencial de treball aplicat per a dur a terme l'oxidació de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ s'ha fixat a partir dels voltamperogrames cíclics enregistrats a l'apartat anterior.

5.2.3 *OPTIMITZACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MB PER AL DESENVOLUPAMENT D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH*

Atesa la capacitat que ha mostrat el polímer de polisulfona per acceptar grafit al seu interior, s'ha procedit a incorporar MB a la seva estructura, amb l'objectiu de comprovar la capacitat de la membrana formada per retenir una espècie redox de grandària relativament petita i soluble en solució aquosa, així com per avaluar els elèctrodes formats com a quimiosensors per a la determinació de NADH.

5.2.3.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB

La preparació d'aquestes membranes s'ha realitzat seguint la metodologia descrita a § 5.2.2.1, però amb un pas previ que consisteix en mesclar homogèniament amb el grafit en pols el percentatge en pes necessari de mediador MB. D'aquesta manera, els percentatges finals de cadascun dels components de la mescla inicial han estat: 82.64 % polisulfona, 16.53 % grafit i 0.83 % MB.

5.2.3.2 Caracterització electroquímica

Mitjançant la comparació dels voltamperogrames cíclics obtinguts per a tampó fosfat 0.05 i KCl 0.05 M a pH 7.3 i per a la mateixa solució però amb NADH 1 mM, quan s'usa com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona i grafit, amb o sense MB, s'han fixat els potencials òptims de treball per a l'oxidació de NADH mediatitzada o directa, respectivament. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de 50 mV·s⁻¹.

5.2.3.2.1 Estudis voltamperomètrics

Amb l'objectiu d'estudiar si la velocitat de reacció ve limitada per la reacció a la superfície de la membrana o bé pel transport per difusió a l'interior d'aquest compòsit de grafit-polisulfona, s'han efectuat voltamperogrames cíclics a diferents velocitats d'escombrat entre 0.04 i 0.18 V·s⁻¹, a fi d'estudiar la relació existent entre la intensitat de corrent dels pics d'oxidació i reducció amb la velocitat d'escombrat.

5.2.3.2.2 Estudis amperomètrics

Un cop demostrada la capacitat dels elèctrodes preparats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona per a ésser emprats com a transductors amperomètrics, es va estudiar el seu comportament quan s'empren com a sensors químics per a la determinació del cofactor NADH. L'experiment s'ha realitzat tant per a la detecció directa quan s'usen elèctrodes recoberts amb membranes de polisulfona amb grafit, com a través del mediador MB quan es fan servir els mateixos elèctrodes però amb el mediador incorporat a la matriu de polisulfona. Segons si s'ha utilitzat un tipus de sensor o l'altre, s'ha aplicat respectivament 0.825 V o -0.100 V com a potencial de treball, valors deduïts dels corresponents voltamperogrames cíclics. Les mesures amperomètriques s'han obtingut de les addicions de microvolums d'una solució de NADH 1.6 mM a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3.

5.2.3.3 Espectroscòpia d'impedàncies

L'espectroscòpia d'impedàncies és una tècnica analítica que permet determinar variables implicades en una gran varietat de processos, com per exemple, transport de masses, velocitat de reaccions químiques, propietats dielèctriques, influència de la composició de diversos materials en la seva conductivitat, etc.²¹ Per tant, pot esdevenir molt útil com a font d'informació inicial de sistemes electroquímics nous. En realitat, qualsevol procés que té lloc a una cel·la electroquímica, pot ésser modelat en base a diferents combinacions d'elements elèctrics, com per exemple resistències o condensadors, a fi d'obtenir circuits equivalents que simularan la resposta del sistema electroquímic. En funció del circuit que representa el sistema a estudiar, s'obtenen diferents respostes de la mesura

de les impedàncies quan es varia la freqüència. Els diagrames habitualment emprats per representar els resultats obtinguts, són el de *Bode*, que mostra la freqüència en funció de l'angle de desfasament entre voltatge i intensitat, i el de *Nyquist*, que s'explicarà tot seguit.

S'han dut a terme mesures d'impedància quan s'utilitzen diferents membranes de polisulfona dipositades sobre els elèctrodes de grafit-epoxi emprats. Aquestes mesures han permès avaluar la conductivitat de les membranes preparades amb diferents concentracions de polisulfona, així com l'efecte resultant sobre la resistència total quan es modifica aquesta concentració i quan, a més, s'addiciona grafit i en darrer lloc un mediador redox a fi d'obtenir els composts de grafit-polisulfona modificats.

Un cop preparats aquests elèctrodes, s'han submergit en tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3 durant 10 minuts com a etapa d'estabilització. Tot seguit s'han adquirit les mesures d'impedància, que en aquest cas s'han presentat com a gràfics de Nyquist²², que corresponen a la representació de les *impedàncies reals* (Z') en front de les *impedàncies imaginàries* (Z''). Per obtenir aquestes mesures, s'ha fixat un potencial d'aproximadament 0 V, car en tots els casos estudiats és en aquesta zona de potencial on no hi ha reacció faradaica. En aquest sistema la cel·la electroquímica es representa com a un *circuit de Randles*, que implica la *resistència de la membrana* i la *capacitat de la doble capa*, a més de la *resistència de la solució* i d'un altre tipus de resistència, anomenada *resistència de Warburg*, deguda a la transferència de massa entre la solució i la superfície de l'elèctrode. Tots aquests paràmetres es poden calcular a partir de la representació de Nyquist. Els gràfics de Nyquist es poden dividir en dues regions clarament diferenciades. A valors elevats de freqüència apareix un semicercle, que es caracteritza per respondre a un *control cinètic* en què domina la transferència electrònica entre l'elèctrode i la membrana. En l'altre extrem, és a dir, a valors baixos de freqüència, el gràfic mostra una línia quasi recta, típica d'un *control per difusió* que esdevé dominant quan la difusió d'electrons a través de la membrana es converteix en el factor més important. Així, la resistència de la membrana ve fixada pel punt que defineix la separació entre el control cinètic i el control per difusió de la reacció, és a dir, pel punt en que convergeixen el semicercle i la recta que constitueixen la representació de Nyquist. Aquesta resistència inclou la resistència que ofereix la solució (R_s) i la resistència que troba la transferència electrònica heterogènia (R_p), és a dir, com més ràpida sigui la velocitat de transferència electrònica, més petit serà el valor de R_p . D'altra banda, un cop es coneix el valor de R_s , és possible calcular la capacitat a partir del valor de freqüència per al valor màxim de Z'' . Val a dir que s'esperen efectes oposats sobre la resistència i la capacitat associades a les membranes.

5.2.3.4 Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat

La microscòpia electrònica d'escombrat esdevé una eina de gran utilitat per a la visualització de la morfologia de membranes polimèriques, tant de la seva superfície com de la seva secció transversal, atès que posseeix un poder de resolució de l'ordre de 100 nm. Aquesta tècnica es fonamenta en el fet que quan es fa incidir un feix d'electrons sobre la mostra, una part dels electrons aconseguixen

travessar la mostra, una altra part són absorbits, i la resta retornen enrera. D'entre aquests darrers, hi ha els anomenats electrons secundaris, que són recollits per un detector, on són convertits en un voltatge i amplificats. Segons si la mostra presenta zones que sobresurten o clots enfonsats, el detector rebrà més o menys electrons secundaris respectivament. El voltatge obtingut s'aplica a un tub de raigs catòdics, fet que acaba modulant la intensitat dels punts de llum que apareixen sobre la seva superfície. Per tant, una imatge de microscòpia electrònica d'escombrat correspon a tots aquests punts de llum de diferent intensitat que es troben sobre la superfície del tub de raigs catòdics i que, en definitiva, el que mostren és la *topografia* de la mostra.

Un cop preparades totes les membranes amb els pertinents recobriments d'or, senceres o amb un tall que exposa la seva secció transversal, efectuat després de la seva congelació en nitrogen líquid, s'han visualitzat per microscòpia electrònica d'escombrat a diferents augments, a fi d'extreure la màxima quantitat d'informació possible sobre l'estructura que posseeixen.

5.2.3.5 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

Si bé l'espectroscòpia d'infraroig té aplicacions tant en el camp de l'anàlisi qualitativa com de la quantitativa, en aquest estudi s'ha emprat amb l'objectiu de caracteritzar l'estructura de les membranes de polisulfona a nivell estrictament qualitatiu, atesa la complexitat dels espectres obtinguts en la zona de l'*infraroig mitjà*. Aquestes mesures esdevindran de gran utilitat a l'hora de fer estudis comparatius, com si d'una empremta digital es tractés.

Només les molècules que presenten petites diferències energètiques entre diferents *estats vibracionals* i *rotacionals* poden absorbir *radiació infraroja*. Per tant, donaran espectres a l'infraroig amb informació valuosa les molècules asimètriques que experimenten un canvi net en el seu *moment dipolar* com a conseqüència del seu moviment, especialment de vibració, i en el cas de l'infraroig llunyà també de rotació.

S'han enregistrat els espectres d'infraroig de membranes de polisulfona, grafit-polisulfona i grafit-polisulfona amb MB, amb l'objectiu de comparar quin efecte provoca l'addició de diferents modificadors a l'estructura de la polisulfona.

5.2.4 AVALUACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB DIFERENTS MEDIADORS REDOX I SELECCIÓ DE L'ELÈCTRODE MÉS EFICIENT COM A QUIMIOSENSOR PER A NADH

Com ja s'ha comentat prèviament, l'elecció del mediador redox que ha de formar part d'un quimiosensor adreçat a la determinació de NADH, resulta ésser tan important com la forma en què aquest mediador s'ha d'incorporar al sistema desenvolupat. És per això, que un cop comprovada la capacitat de la polisulfona com a matriu per a la incorporació del mediador MB, s'ha decidit estudiar el comportament de quimiosensors basats en el mateix disseny, però que incorporen diferents mediadors

redox. L'optimització del sensor que mostri les característiques electroquímiques òptimes envers la determinació de NADH, es presentarà com a base fonamental per al desenvolupament de biosensors basats en enzims deshidrogenases, atès que aquests biosensors fonamenten la seva detecció en l'oxidació del cofactor NADH. Així doncs, aquesta etapa representa un punt molt important per al desenvolupament de biosensors amb múltiples aplicacions, atesa la gran varietat d'enzims deshidrogenasa que es coneixen i, com a conseqüència, de possibles analits que corresponen a espècies implicades en les reaccions d'aquest tipus d'enzims.

5.2.4.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb diferents mediadors redox

S'ha seguit la metodologia descrita a § 5.2.3.1, però amb la incorporació a la solució inicial de polisulfona de diferents mediadors a part del MB, prèviament mesclats de manera homogènia amb el grafit en pols. La resta de mediadors estudiats han estat: p-BQ, DCPIP, o-PDA i 3,4-DHB. De nou els percentatges finals de cadascun dels components de la mescla inicial han sigut: 82.64 % polisulfona, 16.53 % grafit i 0.83 % MB. Aquestes mescles es dipositen com a membranes sobre la superfície electròdica de compòsits de grafit-epoxi.

5.2.4.2 Caracterització electroquímica

Amb l'objectiu de determinar els potencials òptims d'oxidació del NADH, s'omple la cel·la electroquímica amb una solució de NADH 1 mM preparada en tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3 i es realitzen voltamperogrames cíclics per a cadascun dels elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona i grafit modificades amb els diferents mediadors redox.

5.2.4.3 Avaluació de la resposta a NADH

De nou les mesures amperomètriques s'han efectuat mitjançant l'addició de microvolums d'una solució de NADH 1.6 mM a una cel·la electroquímica que conté 10 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. El potencial de treball per a cada mediador emprat, s'ha fixat a partir dels voltamperogrames cíclics obtinguts prèviament.

5.2.4.4 Estabilitat i reproductibilitat dels elèctrodes preparats amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB

L'estudi de l'estabilitat i reproductibilitat dels elèctrodes basats en membranes de polisulfona i grafit, modificades amb mediadors, s'ha realitzat amb els elèctrodes modificats amb les membranes que incorporen el mediador MB, atès que aquests han mostrat un comportament òptim com a

quimiosensors per a la determinació de NADH. L'estudi de l'estabilitat dels sensors emmagatzemats a temperatura ambient, s'ha dut a terme mitjançant la mesura de les variacions de la sensibilitat mitjana extreta de 3 corbes de calibració successives, que s'ha anat avaluant periòdicament durant 2 mesos. L'estabilitat operacional s'ha calculat com la reproductibilitat per a 10 corbes de calibració successives obtingudes amb un mateix elèctrode. I finalment, també s'ha avaluat la reproductibilitat en el procés de preparació dels elèctrodes, en base a la variació dels pendents de les corbes de calibració per a 8 elèctrodes diferents preparats seguint el mateix procediment.

5.2.4.5 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB

L'estudi de l'efecte de diferents substàncies, com ara ions o compostos orgànics, sobre la resposta dels quimiosensors desenvolupats per a la determinació de NADH, esdevé de gran interès per al seu ús en matrius reals. De fet, aquest pas és vital per al posterior desenvolupament de biosensors basats en enzims deshidrogenases que seran de gran utilitat si es poden emprar amb mostres reals.

L'estratègia emprada s'ha basat en la mesura relativa dels corrents obtinguts quan s'aplica un potencial de -0.100 V a un elèctrode basat en membranes de polisulfona, grafit i MB, quan a la cel·la electroquímica hi ha una solució de NADH 0.25 mM i quan a més s'afegeixen en aquesta substàncies interferents a una concentració de 0.25 mM . Per l'àcid ascòrbic, degut al seu conegut caràcter interferent pel fet de ser oxidat a potencials relativament baixos i de trobar-se present habitualment en mostres orgàniques reals, s'ha optat per avaluar com interfereix quan es troba a la cel·la en una concentració igual a 0.5 mM . Atès que tots els resultats es mostren com a efectes relatius, el 100% ve donat per la intensitat de corrent corresponent a una solució de NADH 0.25 mM .

5.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.3.1 VALIDACIÓ DE LES MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA COM A NOUS MATERIALS TRANSDUCTORS PER AL DESENVOLUPAMENT DE SENSORS ELECTROQUÍMICS

5.3.1.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona

La deposició de membranes de polisulfona sobre la superfície electròdica de compòsits de grafit-epoxi ha demostrat la capacitat d'aquest polímer per formar membranes homogènies, sempre que es porti a terme una acurada protecció de la humitat de la solució inicial de polisulfona. Si aquesta solució absorbeix aigua, la polisulfona comença a precipitar, fet que afecta greument a la homogeneïtat i, per

tant, a la reproductibilitat de la seva preparació. D'altra banda, destaca també la bona adherència que mostren aquestes membranes dipositades sobre els compòsits de grafit-epoxi, especialment quan incorporen grafit.

La Figura 5.2 correspon a una fotografia amb 6 membranes de polisulfona de diferents percentatges, 0.75, 1.50, 3.75, 7.50, 11.25 i 15 %, dipositades sobre compòsits de grafit-epoxi. Una simple inspecció visual ja dóna indicis de què la polisulfona al 7.50 % és suficientment densa com per recobrir homogèniament la superfície electròdica, sense ésser massa gruixuda, fet que pot ésser contraproductiu per a una difusió àgil de les espècies a detectar a través de la membrana. Més endavant aquestes dades seran confirmades mitjançant anàlisis detallades dels resultats obtinguts amb tots aquests elèctrodes.

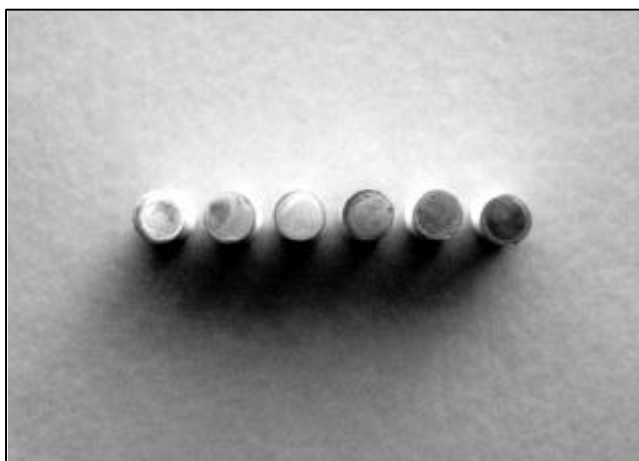


Figura 5.2: Fotografia de sis elèctrodes cilíndrics, situats verticalment, basats en compòsits de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona de diferents percentatges: 15, 11.25, 7.50, 3.75, 1.50 i 0.75%.

5.3.1.2 Caracterització electroquímica

A la Figura 5.3, es mostren els voltamperogrames cíclics, en absència i en presència de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$, obtinguts quan s'empra com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi cobert amb una membrana de polisulfona, sense o amb grafit. S'observa com, per a tots els casos, un potencial de treball de 0.250 V és suficient per a l'oxidació de l'espècie $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$. Tanmateix és important destacar l'augment del valor de la intensitat de corrent per al pic d'oxidació, que esdevé quasi 4 vegades més gran, quan es treballa amb membranes de polisulfona amb grafit en comparació als resultats obtinguts quan es treballa amb membranes sense grafit. Això és, sens dubte, degut a la barrera difusional que representa una membrana de polisulfona no conductora. De fet, és interessant remarcar la similitud de la resposta obtinguda per a un compòsit de grafit-epoxi sense membrana i per a un recobert amb

membrana de polisulfona amb grafit, fet que s'explica per l'augment de conductivitat de la membrana quan se li addiciona aquest material conductor.

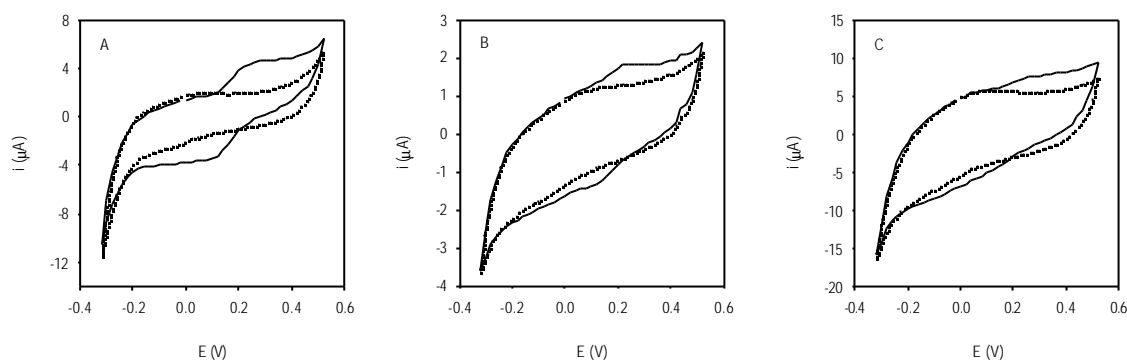


Figura 5.3: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'utilitza com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi sense membrana (A) o recobert amb una membrana de polisulfona (B) sense grafit i (C) amb grafit. A tots els gràfics la línia de punts correspon a l'electròlit suport, mentre que el voltamperograma representat per una línia contínua correspon a una solució de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ 0.076 mM. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

5.3.1.3 Avaluació de la resposta a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$

A la Taula 5.1 s'inclouen els paràmetres de calibració corresponents a l'avaluació de corbes de calibració successives per a la determinació de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$, quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi sense membrana, o bé recobert amb una membrana de polisulfona amb i sense grafit. El potencial de treball aplicat en tots els casos ha estat 0.250 V, valor fixat a partir dels voltamperogrames cíclics mostrats a la Figura 5.3.

Taula 5.1: Paràmetres de calibració de les corbes de calibració per a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ obtingudes quan s'empra un compost de grafit-epoxi sense membrana o amb membrana de polisulfona, amb o sense grafit, com a elèctrode de treball. Tots els càlculs s'han fet per $n=3$. L'interval de concentracions de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ avaluat ha estat de $4.0 \cdot 10^{-6}$ a $5.2 \cdot 10^{-4}$ M. El potencial de treball aplicat ha estat 0.250 V.

| CONFIGURACIÓ ELECTRÒDICA | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (mA/M) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) |
|--|--|--------------------------|----------------------------|
| Sense membrana | 17 | 0.9999 | 1 |
| Amb membrana de polisulfona | 0.7 | 0.9989 | 5 |
| Amb membrana de polisulfona amb grafit | 25 | 0.9983 | 4 |

En base a la comparació dels valors dels pendents de les corbes de calibració obtingudes per a compòsits sense membrana i amb membrana de polisulfona sense grafit, es pot corroborar que atès que es tracta d'un polímer no conductor, la resposta obtinguda quan es mesura l'oxidació de l'ió $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ és inferior, degut a la limitació difusional d'aquests ions a través dels porus de la membrana. Quan s'incorpora grafit a la polisulfona, s'obtenen compòsits elèctricament conductors que, ara sí, un cop dipositats sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi, permeten una transferència electrònica ràpida sobre la seva superfície, tal com ho demostra la sensibilitat obtinguda amb aquest tipus d'elèctrodes, fins i tot superior a l'obtinguda per a elèctrodes sense membrana. Aquesta millora s'explica tant per l'increment de la conductivitat, com per l'augment de la superfície electròdica efectiva que provoca la presència del grafit a l'interior del polímer de polisulfona, car el polímer permet la difusió de la solució al seu través, fet que afavoreix el contacte entre el grafit i la solució de treball. A més, els elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona amb grafit posseeixen un avantatge addicional i és que mostren temps de resposta més curts.

En quant al percentatge òptim de grafit escollit, ha estat d'un 16.5 %, atès que permet una bona formació de les membranes, que evita la formació d'esquerdes provocades per un excés de grafit que pot acabar trencant l'estructura porosa, i alhora és suficient com per assegurar una adequada transferència de càrrega.

5.3.2 OPTIMITZACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB MB PER AL DESENVOLUPAMENT D'UN QUIMIOSENSOR PER A NADH

5.3.2.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB

Si bé la incorporació de grafit a la polisulfona que un cop precipita és de color blanc, fa que les membranes siguin negres, l'addició del mediador MB es confirma per la coloració lila que adopta la membrana negra dipositada sobre la superfície dels compòsits de grafit-epoxi. Aquesta coloració persisteix després de múltiples rentats, així com després d'haver emprat els elèctrodes per a l'obtenció de diverses corbes de calibració. A més, la presència del mediador no altera l'homogeneïtat de les membranes, ni la seva adherència a la superfície electròdica, fet que esdevé lògic en base al petit percentatge de mediador addicionat.

5.3.2.2 Caracterització electroquímica

A partir del corresponent voltamperograma cíclic inclòs a la Figura 5.7, s'ha escollit -0.1 V com a potencial de treball per a l'oxidació de NADH quan es treballa amb un compòsit de grafit-epoxi, recobert amb una membrana de polisulfona que incorpora grafit i MB, com a elèctrode de treball.

5.3.2.2.1 Estudis voltamperomètrics

A partir dels voltamperogrames cíclics mostrats a la Figura 5.4(A), obtinguts per a diferents velocitats d'escombrat quan es treballa amb un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de polisulfona amb grafit i MB com a elèctrode de treball, s'ha estudiat la relació entre la intensitat de corrent dels pics d'oxidació i reducció i la velocitat d'escombrat. La relació lineal que s'observa entre la intensitat dels pics i l'arrel quadrada de la velocitat d'escombrat, que es mostra a la Figura 5.4(B), confirma que la intensitat dels pics d'oxidació i reducció mostra un comportament típic d'un control de la velocitat de reacció basat en el transport per difusió d'ambdues espècies del mediador, tant l'oxidada com la reduïda, a través del compost de grafit-polisulfona amb mediador.

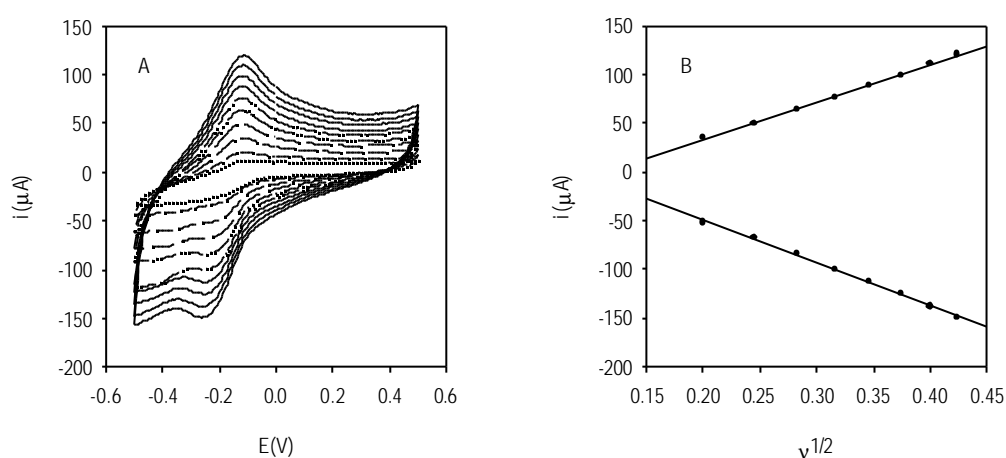


Figura 5.4: (A) Voltamperogrames cíclics obtinguts quan s'empra un compost de grafit-epoxi recobert amb polisulfona amb grafit i MB com a elèctrode de treball, per a diferents velocitats d'escombrat: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 i 180 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, que per ordre van des del voltamperograma de la línia de punts fins al de traç més gruixut. La cel·la electroquímica conté també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. (B) Relació lineal entre la intensitat dels pics de corrent anòdic i catòdic i l'arrel quadrada de la velocitat d'escombrat.

5.3.2.2.2 Estudis amperomètrics

Amb l'objectiu de demostrar la capacitat de les membranes basades en composts de grafit-polisulfona, amb o sense mediador MB, per a ésser emprades en el desenvolupament de sensors químics per a la determinació del cofactor NADH, s'han obtingut corbes de calibració successives per a elèctrodes preparats amb aquest tipus de membranes amb diferents percentatges de polisulfona. Els resultats mostrats a la Taula 5.2 indiquen una clara millora de la reproductibilitat dels pendents de corbes de calibració successives quan es treballa amb membranes de grafit-polisulfona respecte als resultats obtinguts per a elèctrodes sense aquesta membrana. A més, s'ha comprovat que la reproductibilitat de la sensibilitat per a un elèctrode sense membrana de polisulfona es troba afectada per la disminució

progressiva dels pendents de corbes de calibració consecutives, com a conseqüència de la passivació de la superfície electròdica, mentre que per als elèctrodes preparats amb membranes de grafit-polisulfona, el valor per aquest paràmetre prové de l'aleatorietat dels pendents obtinguts.

Malgrat la millora que suposa la presència de membranes de polisulfona a l'hora d'obtenir corbes de calibració molt més reproduïbles, aquestes mateixes membranes són les responsables d'una marcada disminució de la sensibilitat respecte a l'obtinguda per a un compost de grafit-epoxi sense modificar. Per aquest motiu s'ha incorporat un mediador d'oxidació-reducció a la polisulfona modificada amb grafit, adreçat a facilitar la transferència electrònica sobre la superfície electròdica, fet que es veu reflectit en la possibilitat de treballar a potencials molt inferiors, alhora que implica un augment notable de la sensibilitat, que per a algunes concentracions de polisulfona arriba a ser comparable a la d'un sensor de grafit-epoxi sense membrana addicional.

Taula 5.2: Paràmetres de calibració de les corbes de calibració per a NADH obtingudes quan s'empra un compost de grafit-epoxi sense membrana o amb membrana de polisulfona amb grafit, amb o sense mediador MB, com a elèctrode de treball. Cada elèctrode s'ha recobert amb composts de grafit-polisulfona preparats amb polisulfona de diferents concentracions. Tots els càlculs s'han fet per $n=3$. L'interval de concentracions de NADH avaluat ha estat de $1.0 \cdot 10^{-5}$ a $1.6 \cdot 10^{-4}$ M.

| TIPUS DE MEMBRANA (concentració de Ps, %) | E_{ap} (V) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (mA/M) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) |
|--|--------------|--|--------------------------------|-------------------------------|
| Sense membrana | 0.650 | 49.8 | 0.9984 | 15 |
| MB-Ps (0.75%) | -0.100 | 18.3 | 0.9983 | 5 |
| MB-Ps (1.50%) | -0.100 | 9.9 | 0.9988 | 6 |
| MB-Ps (3.75%) | -0.100 | 10.4 | 0.9989 | 4 |
| Ps (7.50%) | 0.650 | 3.7 | 0.9975 | 5 |
| MB-Ps (7.50%) | -0.100 | 52.1 | 0.9994 | 1 |
| MB-Ps (11.25%) | -0.100 | 48.4 | 0.9985 | 7 |
| MB-Ps (15%) | -0.100 | 1.6 | 0.9972 | 16 |

D'acord amb els resultats recollits a la Taula 5.2 s'han escollit com a òptims, per a continuar aquest estudi, els elèctrodes basats en composts de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona amb grafit i MB, preparades a partir de polisulfona al 7.50 %, atès que són els que han mostrat una major sensibilitat i una millor reproductibilitat entre calibracions successives realitzades amb un mateix elèctrode.

5.3.2.3 Espectroscòpia d'impedàncies

La Figura 5.5 mostra com a exemple la sèrie de gràfics de Nyquist, és a dir de la representació de les impedàncies reals (Z') en front de les impedàncies imaginàries (Z''), per a tres elèctrodes preparats amb polisulfona de la mateixa concentració (15 %), però que es diferencien en si a més se'ls ha incorporant grafit o grafit i MB conjuntament.

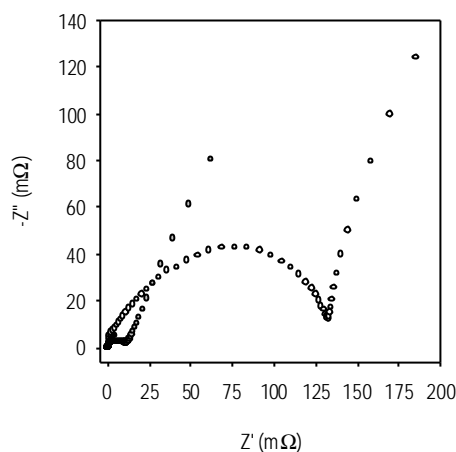


Figura 5.5: Gràfics de Nyquist per a la representació de les impedàncies reals en front de les impedàncies imaginàries, obtinguts quan s'empra com a electrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb polisulfona al 15 % (cercles blancs), polisulfona al 15 % i grafit (cercles grisos) i polisulfona al 15 %, grafit i MB (cercles negres). La cel·la electroquímica conté també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.3. L'amplitud del voltatge de l'ona sinusoidal ha estat de 0.2 V.

En aquesta figura s'observa com amb l'addició de grafit i, encara més remarcable, quan a més s'addiciona MB al compost emprat per a la formació de les membranes, la regió corresponent al control cinètic que es situa a altes freqüències disminueix, fet que implica una conducció elèctrica facilitada.

A partir d'aquests gràfics de Nyquist obtinguts per a elèctrodes preparats amb diferents membranes de polisulfona, s'han obtingut els valors de resistència i capacitat inclosos a la Taula 5.3.

Taula 5.3: Valors de resistència i capacitat, extrets dels corresponents gràfics de Nyquist, per a elèctrodes basats en composts de grafit-epoxi recoberts amb membranes de polisulfona de diferents concentracions. Tots els càlculs s'han fet per $n=3$.

| TIPUS DE MEMBRANA | RESISTÈNCIA (Ω) | CAPACITAT (F) |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Ps (15 %) | $1.43 \cdot 10^5$ | $1.02 \cdot 10^{-14}$ |
| Grafit-Ps (15 %) | $1.60 \cdot 10^4$ | $6.64 \cdot 10^{-12}$ |
| MB-grafit-Ps (15 %) | $8.54 \cdot 10^4$ | $3.12 \cdot 10^{-8}$ |
| Ps (11.25 %) | $2.17 \cdot 10^2$ | $1.21 \cdot 10^{-8}$ |
| Grafit-Ps (11.25 %) | $1.47 \cdot 10^2$ | $1.78 \cdot 10^{-8}$ |
| MB-grafit-Ps (11.25 %) | $1.17 \cdot 10^2$ | $2.03 \cdot 10^{-8}$ |
| Ps (7.50 %) | $8.11 \cdot 10^1$ | $9.21 \cdot 10^{-9}$ |
| Grafit-Ps (7.50 %) | $7.09 \cdot 10^1$ | $1.03 \cdot 10^{-8}$ |
| MB-grafit-Ps (7.50 %) | $7.06 \cdot 10^1$ | $1.14 \cdot 10^{-8}$ |
| Ps (3.75 %) | $6.80 \cdot 10^1$ | $4.36 \cdot 10^{-8}$ |
| Grafit-Ps (3.75 %) | $6.51 \cdot 10^1$ | $7.03 \cdot 10^{-8}$ |
| MB-grafit-Ps (3.75 %) | $5.77 \cdot 10^1$ | $7.42 \cdot 10^{-8}$ |
| Ps (1.50 %) | $1.49 \cdot 10^2$ | $4.01 \cdot 10^{-8}$ |
| Grafit-Ps (1.50 %) | $6.85 \cdot 10^1$ | $6.90 \cdot 10^{-8}$ |
| MB-grafit-Ps (1.50 %) | $6.58 \cdot 10^1$ | $7.21 \cdot 10^{-8}$ |
| Ps (0.75 %) | $5.72 \cdot 10^1$ | $5.75 \cdot 10^{-8}$ |
| Grafit-Ps (0.75 %) | $5.53 \cdot 10^1$ | $6.62 \cdot 10^{-8}$ |
| MB-grafit-Ps (0.75 %) | $5.28 \cdot 10^1$ | $7.57 \cdot 10^{-8}$ |
| Sense membrana | $4.93 \cdot 10^1$ | $7.10 \cdot 10^{-8}$ |

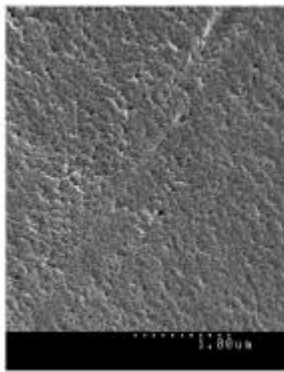
Aquests resultats demostren que la disminució de la concentració de polisulfona, així com la incorporació de grafit a la membrana i, encara més destacable, l'addició de mediador MB a la mateixa membrana, són factors que porten a una important reducció de la resistència aparent, com a conseqüència de l'augment de conductivitat que tots ells provoquen. Per tant, es pot concloure que aquest estudi d'impedàncies presenta uns resultats que concorden amb els obtinguts mitjançant mesures amperomètriques, car només la polisulfona més concentrada (15 %) ofereix una resistència prou elevada com per fer inviable l'ús dels sensors recoberts amb ella. És per tot això, que la concentració de polisulfona escollida ha d'ésser un compromís entre aquella que ofereixi una elevada

sensibilitat i una baixa resistència. Aquest punt òptim s'ha trobat amb els elèctrodes preparats amb composts de polisulfona al 7.50 %, que tanmateix coincideix amb la concentració que visualment ja oferia les millors característiques d'homogeneïtat i gruix de membrana. D'altra banda, la capacitat de la membrana depèn de diversos factors, entre els que s'inclouen la naturalesa i la densitat de càrrega superficial de la membrana, així com el tipus i quantitat de mediador incorporat. D'aquí s'infereix que un augment de la capacitat és degut a un increment de la constant dielèctrica. A més, és important indicar que en base a la relació directa existent entre la superfície accessible a la solució i els valors de capacitat, esdevé evident la millora en la superfície de la membrana que permet l'accés de la solució per a tots els elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona de concentracions inferiors al 15 %, fet que de nou confirma la idoneïtat de l'ús de polisulfona al 7.50 % per a la preparació dels composts a aplicar com a membranes sobre la superfície electròdica.

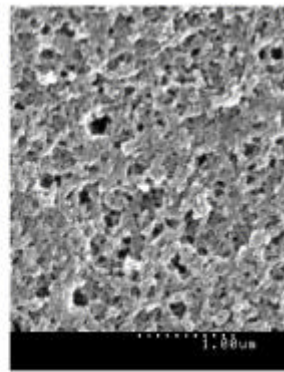
5.3.2.4 Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat

La microscòpia electrònica d'escombrat ha permès estudiar i comparar la morfologia de la superfície i de la secció transversal de diverses membranes de polisulfona, preparades a partir de diferents concentracions d'aquest polímer, algunes d'elles amb grafit i mediador redox al seu interior. L'estudi de les micrografies obtingudes confirma una forta dependència de la morfologia superficial d'aquestes membranes amb la concentració de la polisulfona emprada en la seva preparació. Quan es comparen les micrografies corresponents a la superfície de membranes preparades amb polisulfona al 15 % i al 7.50 % (Figura 5.6, micrografies A i B), es fa palès l'increment en la porositat de la membrana de polisulfona al 7.50 %, responsable de la disminució de la resistència a la transferència de massa que té lloc com a conseqüència del transport per difusió de matèria. Aquesta afirmació concorda amb els resultats anteriors que mostraven magnituds de resposta superiors per a elèctrodes recoberts amb membranes de polisulfona al 7.50 % que per als preparats amb membranes de polisulfona al 15 %. La comparació amb altres micrografies de membranes preparades amb concentracions inferiors de polisulfona, permet concloure que aquestes membranes presenten una superfície exterior generalment més accidentada i més oberta que quan s'han preparat amb polisulfona concentrada, ja que aquestes darreres mostren superfícies més llises i menys accessibles per a les espècies que es trobin a la solució que les envolta. Aquesta tendència esdevé vàlida fins que la concentració de polisulfona és tan petita que només permet la formació de membranes molt primes i fràgils, que mostren una adherència defectuosa sobre la superfície de grafit-epoxi, alhora que es caracteritzen per la formació de porus suficientment laxos com per a que fins i tot molècules grans, com poden ser els enzims, puguin difondre a través d'ells i s'acabin perdent a la solució en què es trobin submergides. En resum però, es pot dir que la superfície de les membranes de polisulfona és força plana i llisa (fet que alhora es confirma amb les vistes de les seccions transversals de diverses membranes, com les mostrades a la Figura 5.6, micrografies D i E, on es mostra la superfície exterior a la part de dalt, que correspon a la superfície que queda exposada quan la membrana es troba col·locada sobre la superfície d'un elèctrode, i l'estructura interior a la part inferior), característiques que només resulten modificades per

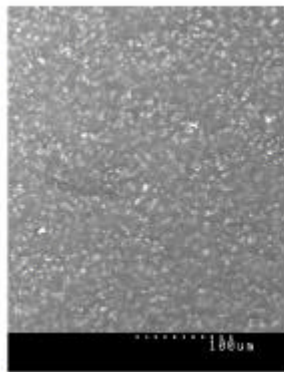
l'increment en la porositat degut a la disminució de la concentració de la solució inicial de polisulfona. Tanmateix, quan s'incorpora grafit a la membrana de polisulfona la superfície adopta una estructura més rugosa i accidentada, que ve caracteritzada per una distribució uniforme de les partícules de grafit per tota la superfície (micrografia C). D'altra banda, la comparació de les micrografies obtingudes per a membranes de grafit-polisulfona, amb o sense MB, confirma que la presència de mediador no afecta a la morfologia de la superfície ni de la secció transversal de les membranes (micrografies C i H per a la superfície i, E i I per a la secció transversal). Malgrat l'increment de la rugositat que s'assoleix quan s'addiciona grafit a la polisulfona, i de l'augment de la porositat quan s'empra una polisulfona al 7.50 %, fet que esdevé molt important per a la permselectivitat d'aquestes membranes, sembla ésser que els compòsits obtinguts no són suficientment rugosos i porosos com per què es pugui dur a terme una immobilització enzimàtica per adsorció sobre la superfície de la membrana. En canvi, les micrografies corresponents a les seccions transversals de les membranes, emprades per a l'estudi de la seva morfologia interna (micrografies a diferents augments: D i E o F, G i J) mostren un si de la matriu més adequat per retenir enzims al seu interior, atès que presenten espais buits, pels quals alhora l'analit podrà difondre fàcilment fins arribar a l'enzim immobilitzat. En relació a les micrografies de seccions transversals de les membranes, la corresponent a la membrana de polisulfona al 15 % amb grafit mostra una capa densa, rígida i compacte, d'un gruix aproximat de quasi 100 μm . Per tant, es pot afirmar que aquesta membrana posseeix una elevada densitat que alhora implica una forta resistència al transport de matèria per difusió. La seva porositat és molt baixa i presenta una estructura molt irregular, formada per regions on s'acumulen plaques de grafit enmig de regions de xarxa porosa deguda exclusivament a la polisulfona (micrografies F i G), fet que afecta negativament a la reproductibilitat associada a la preparació d'elèctrodes. Pel que fa a les micrografies de la secció transversal de la membrana de polisulfona al 7.50 % amb grafit (micrografies E i J), s'observa una major porositat, que implica una disminució de la resistència al transport de material al seu través, alhora que presenten una distribució més homogènia de les partícules de grafit al seu interior. En aquest cas la membrana és més prima, amb un gruix aproximat de 50 μm . Totes aquestes característiques contribueixen a millorar les propietats de les membranes relacionades amb la seva capacitat per formar capes primes i per retenir enzims en el seu interior, alhora que permeten l'obtenció d'intensitats de corrent més elevades que, en definitiva, fan possible una millora del comportament general dels biosensors que es desenvolupin amb aquest tipus de membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona.



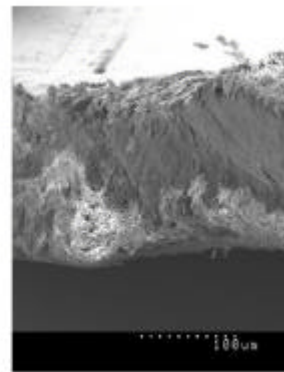
A.



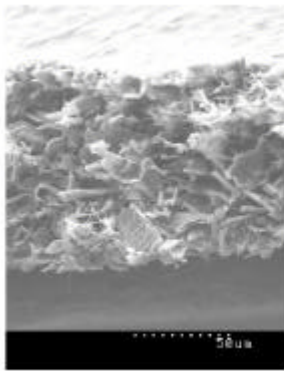
B.



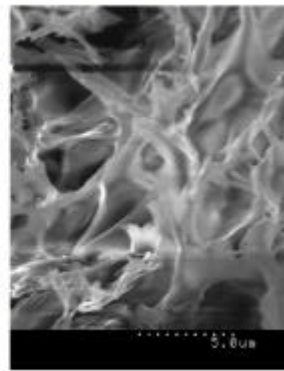
C.



D.



E.



F.

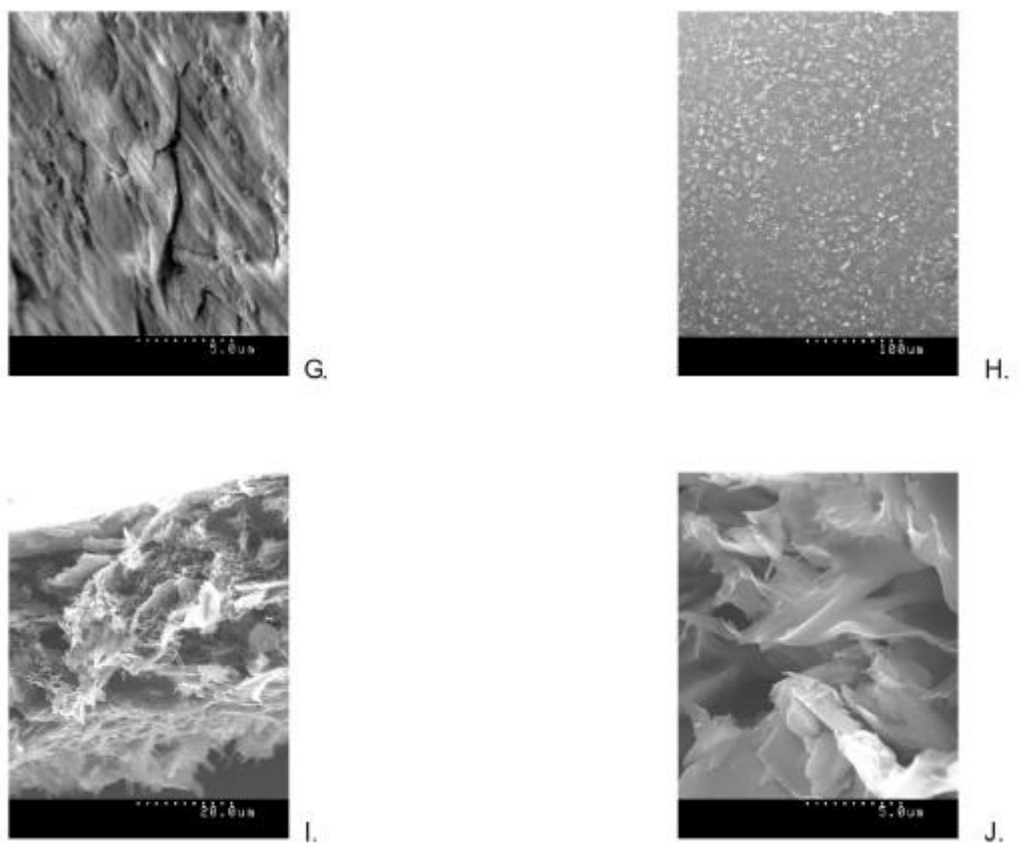


Figura 5.6: Micrografies obtingudes per microscòpia electrònica d'escombrat per a diferents membranes de polisulfona: (A) 15 % polisulfona (1 μm), (B) 7.50 % polisulfona (1 μm), (C) 7.50 % polisulfona i grafit (100 μm), (D) secció transversal de 15 % polisulfona i grafit (100 μm), (E) secció transversal de 7.50 % polisulfona, grafit i MB (50 μm), (F) i (G) secció transversal de 15 % polisulfona i grafit a diferents localitzacions (5 μm), (H) 7.50 % polisulfona, grafit i MB (100 μm), (I) secció transversal de 7.50 % polisulfona i grafit (20 μm) i (J) secció transversal de 7.50 % polisulfona, grafit i MB (5 μm).

5.3.2.5 Caracterització estructural mitjançant espectroscòpia d'infraroig

La Figura 5.7 mostra els espectres d'infraroig emprats en la caracterització de les membranes de polisulfona. L'espectre obtingut per a una membrana de polisulfona sense cap altre component afegit presenta alguns pics d'absorció significatius que es poden atribuir a l'estructura polimèrica. Associats a l'estructura aromàtica apareixen pics ben diferenciables, com són els situats a les regions entre 3080-3030 (tensió del grup C-H), 1665-1430 (C=C) i 900-650 (C-H) cm^{-1} . Tanmateix, algunes bandes intenses situades entre 1430-1000 cm^{-1} són atribuïbles a una estructura de sulfona i, més concretament, les bandes situades entre 1370-1290 i entre 1170-1110 cm^{-1} , són pròpies del grup R-SO₂-R. També s'observen bandes ben diferenciades a la zona situada entre 1310-1000 cm^{-1} ,

característiques de grups èter, que es poden assignar a enllaços C-O. De la comparació de l'espectre per a la polisulfona sense cap additiu amb el corresponent a una membrana de grafit-polisulfona amb MB, caldria esperar només canvis relacionats amb noves bandes atribuïbles a l'aromaticitat del mediador MB. Val a dir però, que ambdós espectres es solapen quasi totalment, de manera que es fa palesa l'absència de noves bandes d'absorció, així com de desplaçaments de les bandes ja existents. Aquest fet pot ésser degut a que l'efecte propi del MB queda amagat entre les bandes del polímer de polisulfona, o bé, el que sembla ésser més probable, pot indicar que la quantitat de MB a la superfície de la membrana és insuficient com per donar cap senyal d'absorció a l'infraroig mitjà, ja que per la metodologia basada en reflectàncies la radiació tan sols penetra uns pocs micròmetres a la membrana, sense aportar informació de l'interior de la membrana on ha quedat retinguda la major part de mediador.

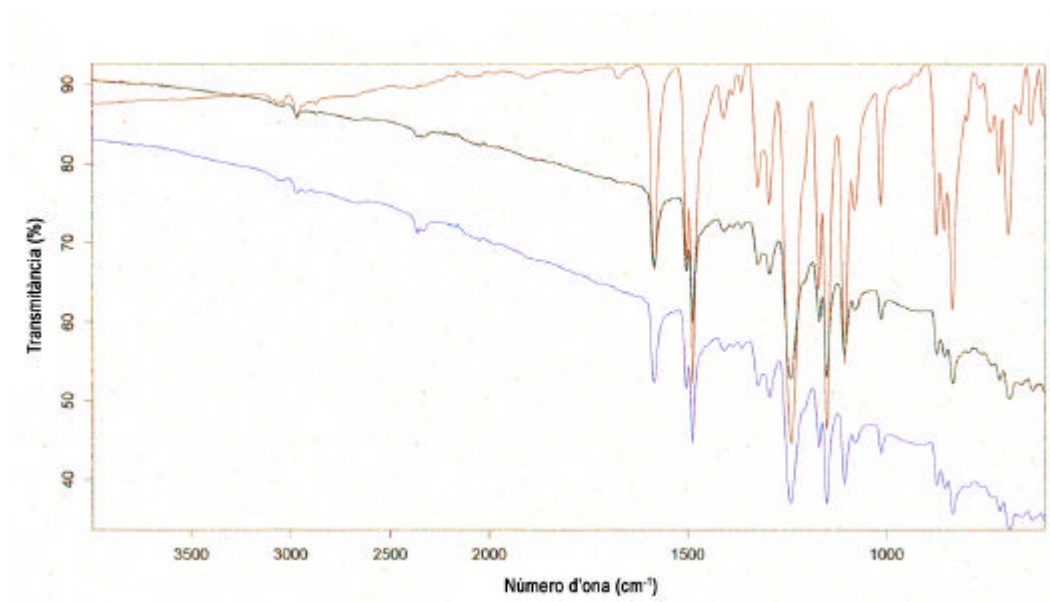


Figura 5.7: Espectres d'absorció en l'infraroig corresponents a diferents membranes de polisulfona: polisulfona (línia vermella), polisulfona amb grafit (línia negra) i polisulfona amb grafit i MB (línia blava).

5.3.3 AVALUACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN COMPÒSITS DE GRAFIT-POLISULFONA MODIFICATS AMB DIFERENTS MEDIADORS REDOX I SELECCIÓ DE L'ELÈCTRODE MÉS EFICIENT COM A QUIMIOSENSOR PER A NADH

5.3.3.1 Preparació de les membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb diferents mediadors redox

La incorporació de tots els mediadors assajats als compòsits de grafit-polisulfona, ha permès l'obtenció de membranes homogènies que mostren una bona adherència a la superfície del compòsit de grafit-epoxi. Només en els casos dels mediadors MB, tal com ja s'ha indicat, i DCPIP, la coloració d'aquests compostos, lila i blava respectivament, permet la confirmació visual de llur presència a l'interior de les membranes.

5.3.3.2 Caracterització electroquímica

La Figura 5.8 inclou els voltamperogrames cíclics obtinguts per a una solució de NADH quan s'utilitza com a elèctrode de treball un compòsit de grafit-epoxi recobert amb diferents membranes de grafit-polisulfona amb cadascun dels mediadors avaluats. A partir d'aquests voltamperogrames s'han determinat els potencials òptims de treball per a cada elèctrode, valors que queden recollits més endavant a la Taula 5.4.

Si es comparen els potencials òptims de treball per a aquest tipus d'elèctrodes amb els obtinguts al Capítol 4 per a cadascun dels mediadors incorporats de diverses maneres al sistema de detecció, es comprova com aquesta estratègia d'immobilització de mediadors redox sobre la superfície electròdica ofereix, en general, amb alguna excepció concreta, els potencials més baixos com a resultat d'una millor reducció del sobrepotencial necessari per a la determinació de l'espècie NADH. Aquest fet palesa la bona disponibilitat de les espècies medidores a l'interior dels compòsits de grafit-polisulfona, que porta a facilitar els processos d'oxidació-reducció entre les molècules de NADH i les partícules de grafit.

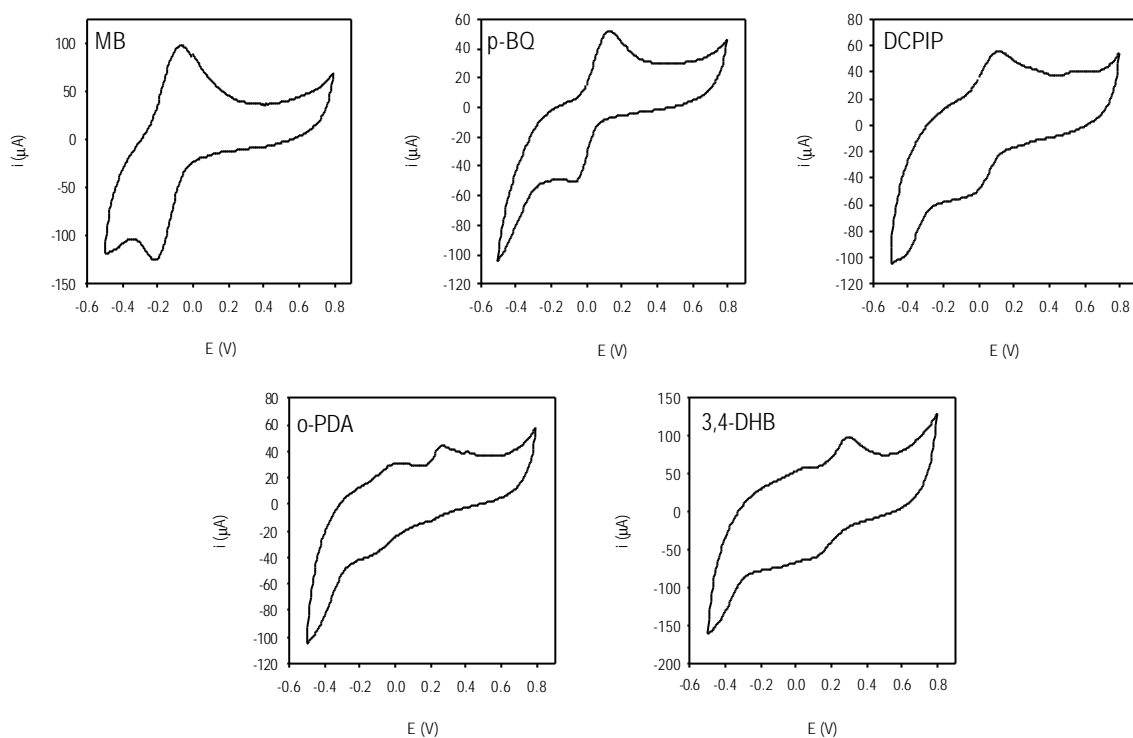


Figura 5.8: Voltamperogrames cíclics obtinguts quan es treballa amb un elèctrode indicador basat en un compost de grafit-epoxi recobert amb una membrana de grafit-polisulfona amb cadascun dels mediadors estudiats. La cel·la electroquímica conté una solució de NADH 1 mM en tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.5.

5.3.3.3 Avaluació de la resposta a NADH

A la Taula 5.4 s'inclouen els paràmetres de calibració obtinguts de l'anàlisi de corbes de calibració successives per a la determinació de NADH, quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb diferents membranes de grafit-polisulfona preparades amb cadascun dels mediadors redox en estudi (vegeu Figura 5.9). Els resultats obtinguts demostren que la incorporació dels mediadors redox assajats a les membranes de grafit-polisulfona, a més de permetre la detecció amperomètrica de l'espècie NADH a uns potencials de treball molt més baixos que el necessari per a un elèctrode del mateix tipus sense membrana, és a dir inferiors a 0.650 V, ofereixen sensibilitats elevades amb uns temps de resposta de pocs segons.

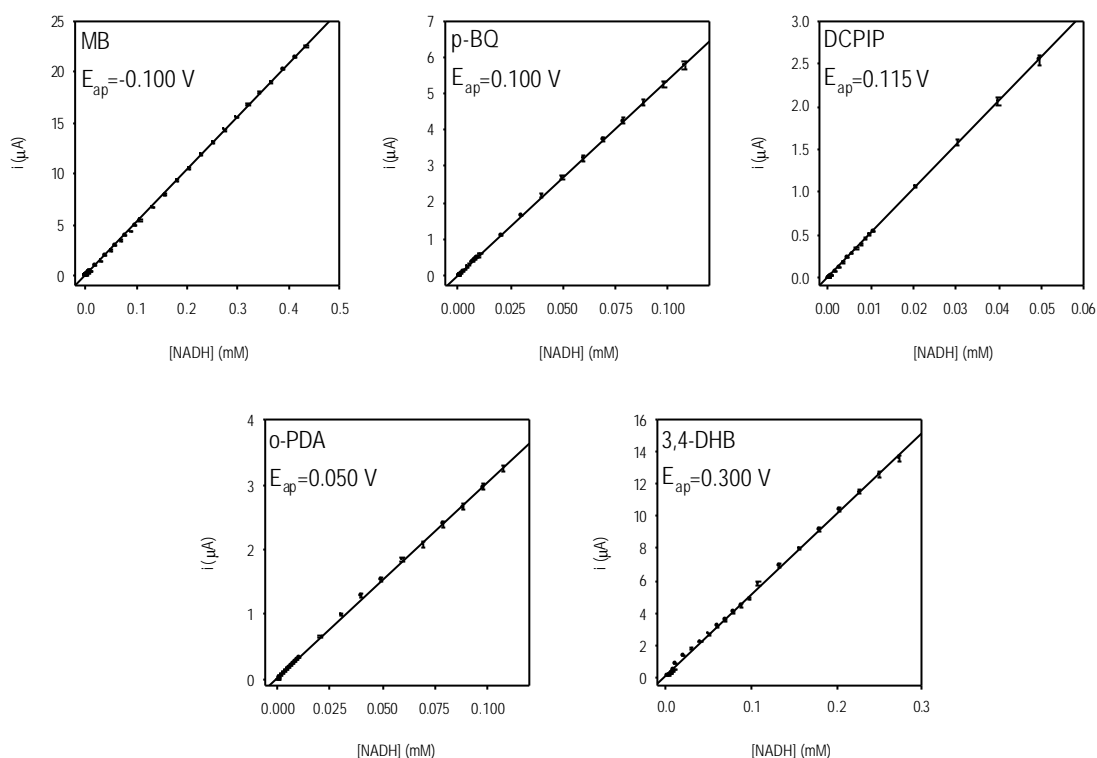


Figura 5.9: Corbes de calibració per a NADH quan s'empra com a elèctrode de treball un compost de grafit-epoxi recobert amb diferents membranes de grafit-polisulfona que incorporen mediadors en el seu interior. A cada gràfic s'indica el mediador present a la membrana de polisulfona i el potencial de treball emprat. Cada corba correspon a la mitjana de 3 corbes de calibració successives, la variabilitat de les quals s'ha representat amb barres d'error corresponents a ± 1 vegada la desviació estàndard associada a la intensitat de corrent mesurada per a cada concentració de NADH assajada.

Taula 5.4: Paràmetres de calibració de les corbes de calibració que es mostren a la Figura 5.9, obtingudes quan s'empra un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi recobert amb membranes de grafit-polisulfona que incorporen cadascun dels mediadors estudiats. Tots els càlculs s'han fet per $n=3$, excepte per a l'elèctrode amb MB, amb el que s'han realitzat 10 corbes de calibració successives.

| MEDIADOR | E_{ap} (V) | INTERVAL LINEAL (M) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (mA/M) | REPRODUCTIBILITAT (RSD, %) |
|----------|--------------|---|--|----------------------------|
| MB | -0.100 | $5.0 \cdot 10^{-8} - 4.3 \cdot 10^{-4}$ | 52.1 | 1 |
| p-BQ | 0.100 | $2.5 \cdot 10^{-7} - 1.1 \cdot 10^{-4}$ | 53.6 | 5 |
| DCPIP | 0.115 | $1.5 \cdot 10^{-7} - 5.0 \cdot 10^{-5}$ | 51.5 | 5 |
| o-PDA | 0.050 | $3.5 \cdot 10^{-7} - 1.1 \cdot 10^{-4}$ | 25.9 | 4 |
| 3,4-DHB | 0.300 | $7.4 \cdot 10^{-7} - 2.7 \cdot 10^{-4}$ | 50.5 | 5 |

És tanmateix interessant fer esment dels amplis intervals lineals que presenten aquests sensors químics per a la determinació de NADH, puix que aquest és un paràmetre important que, en cas de no ser tan favorable, podria representar una greu limitació en l'aplicació de les membranes de polisulfona per al desenvolupament de biosensors basats en enzims deshidrogenases que fonamenten la seva detecció amperomètrica en l'oxidació del cofactor NADH.

5.3.3.4 Estabilitat dels elèctrodes preparats amb membranes basades en composts de grafit-polisulfona modificats amb MB

L'estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge dels elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona i grafit, modificades amb MB, que s'ha basat en un seguiment periòdic durant 2 mesos de les variacions de la sensibilitat mitjana extreta de 3 corbes de calibració successives, demostra la viabilitat per a emmagatzemar aquests elèctrodes a temperatura ambient fins a 40 dies, temps durant el qual es manté més del 97 % de la sensibilitat inicial (vegeu Figura 5.10). És a partir d'aquests 40 primers dies d'emmagatzematge, quan es comença a palesar una pèrdua de sensibilitat, que arriba a ésser quasi d'un 50 % passats els dos primers mesos.

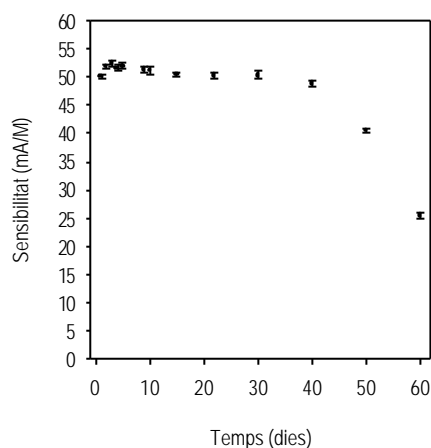


Figura 5.10: Estudi de l'estabilitat d'emmagatzematge dels elèctrodes modificats amb membranes de grafit-polisulfona que incorporen el mediador MB, basat en l'avaluació de la seva sensibilitat a NADH durant un període de 60 dies. Cada punt de la gràfica correspon a la mitjana dels valors de sensibilitat obtinguts per a 3 corbes de calibració successives. Entre mesures, l'elèctrode s'ha emmagatzemat sec a temperatura ambient.

D'altra banda, l'estabilitat operacional ve indicada pel valor de reproductibilitat dels pendents de 10 corbes de calibració successives inclòs a la Taula 5.4 per a l'elèctrode que incorpora MB a la

membrana de polisulfona, que s'ha calculat com a un 1 %. Aquest valor demostra una excel·lent reproductibilitat de les mesures quan s'empra un mateix elèctrode en múltiples ocasions.

Tanmateix, esdevé d'importància cabdal estudiar la reproductibilitat de les respostes obtingudes amb diferents elèctrodes modificats amb membranes de grafit-polisulfona amb MB, atès que inicialment pot semblar difícil assolir recobriments superficials idèntics per a diferents elèctrodes, situació que en cas de no ser possible, implicaria la necessitat d'efectuar en tots els casos una corba de calibració prèvia per a cada elèctrode. Malgrat la preparació manual d'aquest tipus d'elèctrodes, s'ha aconseguit una reproductibilitat entre els pendents de corbes de calibració per a 8 elèctrodes diferents preparats seguint el mateix procediment de tan sols un 6 %, com es mostra a la Figura 5.11.

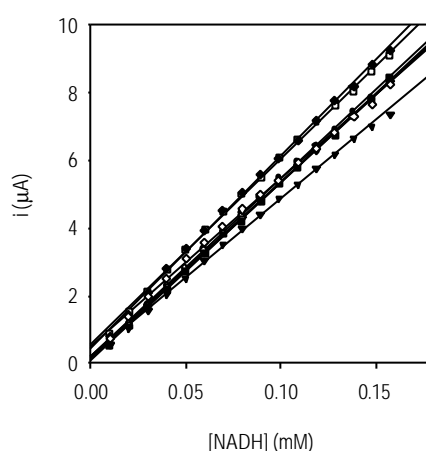


Figura 5.11: Estudi de la reproductibilitat entre corbes de calibració per a NADH obtingudes amb diferents elèctrodes modificats amb membranes de grafit-polisulfona que incorporen el mediador MB, preparats seguint el mateix procediment. S'han avaluat 8 elèctrodes diferents. El potencial de treball ha estat -0.100V .

5.3.3.5 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en compòsits de grafit-polisulfona modificats amb MB

La Taula 5.5 mostra l'efecte relatiu de diferents substàncies interferents sobre la resposta dels quimiosensors desenvolupats quan s'està determinant NADH. En base als percentatges obtinguts, no es pot afirmar que cap compost electroactiu dels avaluats representi una interferència real, atès que no modifiquen significativament el 100 % d'intensitat de corrent corresponent a la mesura d'una solució de NADH 0.25 mM en absència d'altres espècies. Aquest resultat, especialment interessant per a compostos com els àcids ascòrbic i úric, habitualment presents en mostres orgàniques reals, pot ésser degut a l'adequat comportament permselectiu de les membranes de polisulfona envers aquest tipus d'espècies, així com als baixos potencials de treball assolits, que eviten la seva oxidació electroquímica directa, alhora que la seva oxidació electrocatalítica en alguns casos no esdevé facilitada. L'únic

compost que suposa un cert caràcter interferent és el sulfur de sodi, fet que possiblement és conseqüència de la facilitat que presenta per a ésser oxidat.

Taula 5.5: Estudi de l'efecte interferent que provoquen diferents compostos electroactius en la determinació de NADH quan s'utilitza un elèctrode de treball basat en un compost de grafit-epoxi modificat amb una membrana de grafit-polisulfona amb MB. S'han calculat les eficiències relatives quan es mesura la intensitat de corrent deguda a cada espècie en una concentració 0.25 mM, excepte per a l'àcid ascòrbic que ha estat de 0.5 mM, en presència de NADH 0.25 mM. Al senyal obtingut quan només hi ha NADH a la solució se li ha assignat un valor d'eficiència relativa de 100 %. Cada valor correspon a la mitjana de 4 mesures experimentals. El potencial de treball emprat ha estat -0.1 V.

| ESPÈCIE INTERFERENT | EFICIÈNCIA RELATIVA (%) |
|---------------------|-------------------------|
| Àcid L-(+)-ascòrbic | 104.2 |
| Àcid làctic | 100.3 |
| Àcid cítric | 100.5 |
| Àcid úric | 100.2 |
| Tiourea | 101.1 |
| Creatinina | 99.9 |
| Glicocola | 100.1 |
| Penicil·lina G | 99.9 |
| L-tirosina | 100 |
| L-cisteïna | 100.4 |
| L-lisina | 96.9 |
| L-triptòfan | 100 |
| D-(-)-fructosa | 100.2 |
| D-(+)-glucosa | 99.9 |
| Fenol | 100 |
| Sulfur de sodi | 121.2 |

5.4 CONCLUSIONS

Les conclusions extretes del present capítol han estat:

1 L'avaluació dels elèctrodes preparats amb membranes de polisulfona amb grafit vers l'oxidació de l'ió $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$, escollit com a model, mostra sensibilitats superiors a les obtingudes amb els mateixos elèctrodes sense membrana, alhora que ofereixen respostes en temps més curts. Ambdues propietats demostren la capacitat d'aquest nou material per a ésser emprat com a una matriu atractiva per a la incorporació de material biològic, així com d'altres espècies químiques, com ara mediadors d'oxidació-reducció.

2 L'ús de membranes de polisulfona amb grafit en el desenvolupament de quimiosensors per a la determinació de NADH, millora notablement la reproductibilitat entre els pendents per a corbes de calibració successives en comparació a elèctrodes sense modificar. S'ha demostrat que, en el primer cas, la reproductibilitat associada a la sensibilitat prové de valors aleatoris, mentre que quan es treballa sense membranes de polisulfona, és resultat d'una disminució progressiva dels pendents com a conseqüència de la passivació de la superfície electròdica.

3 Si bé la sensibilitat per a la determinació de NADH quan es treballa amb membranes de polisulfona amb grafit disminueix, possiblement per la resistència de la membrana al pas del NADH a través dels seus porus, la incorporació de mediadors redox al compost de grafit-polisulfona facilita la transferència electrònica sobre la superfície electròdica, fet que permet treballar a uns potencials inferiors alhora que augmenta la sensibilitat.

4 Els estudis amperomètrics i d'impedàncies duts a terme coincideixen en mostrar les membranes de polisulfona al 7.50 %, amb grafit al seu interior, com les òptimes pel seu compromís entre una elevada sensibilitat i una baixa resistència. L'addició de grafit i encara més de mediador, porta a una disminució de la resistència aparent com a conseqüència de l'augment de conductivitat.

5 L'estudi morfològic de les membranes de polisulfona mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat, mostra en quin grau la concentració de polisulfona condiciona la porositat, característica que es relaciona amb la resistència que ofereix la membrana a la difusió d'espècies al seu través. De nou la polisulfona al 7.50 % resulta ésser òptima, atès que mostra un compromís entre capes denses i rígides, típiques de concentracions de polisulfona elevades, i capes primes, fràgils, d'adherència defectuosa i amb grans porus per on es poden perdre les espècies que s'intentin immobilitzar, pròpies de concentracions baixes de polisulfona. Aquesta estructura òptima juntament amb la distribució homogènia de les partícules de grafit al seu interior, fa possible la formació de capes primes, en què es poden retenir enzims al seu interior, alhora que permet l'obtenció d'intensitats de corrent elevades.

6 Els espectres d'infraroig han permès caracteritzar les membranes de polisulfona, i han portat a postular que la presència de mediador a la superfície és mínima, i que majoritàriament es troba retingut a l'interior de la membrana, atès que la incorporació d'aquesta espècie a les membranes no implica l'aparició de noves bandes ni el desplaçament de les bandes pròpies del polímer de polisulfona.

7 Les membranes preparades amb un 82.64 % de polisulfona (al 7.50 %), 16.53 % grafit i 0.83 % mediador, mostren les característiques òptimes, tant físiques pel que fa a homogeneïtat i bona adherència, com electroquímiques, donades per una bona reproductibilitat i una elevada sensibilitat.

8 En general, la incorporació dels diferents mediadors estudiats a les membranes de polisulfona permet assolir potencials de treball inferiors als obtinguts amb les altres estratègies d'immobilització avaluades. Tanmateix, s'obtenen sensibilitats elevades, temps de resposta de pocs segons i amplis intervals lineals per a tots els elèctrodes presentats basats en membranes de polisulfona.

9 Els elèctrodes que incorporen MB a la membrana de grafit-polisulfona, han mostrat les característiques òptimes per a ésser emprats com a quimiosensors per a la determinació de NADH, amb una elevada sensibilitat i un potencial de treball de tan sols -0.1 V. Aquests elèctrodes es poden emmagatzemar en sec, a temperatura ambient durant 40 dies, fet que confirma una bona estabilitat d'emmagatzematge. L'estabilitat operacional donada com la reproductibilitat entre corbes de calibració successives, és tan sols d'un 1 %. A més, la preparació d'aquests elèctrodes és senzilla i força reproducible (6 %). Per últim, en relació a les interferències, es pot afirmar que espècies habitualment presents en mostres orgàniques reals, com els àcids ascòrbic i úric, no representen cap interferència significativa, i únicament el sulfur de sodi, pel fet d'ésser una espècie fàcilment oxidable, mostra un cert caràcter interferent.

10 Totes les propietats esmentades i, especialment el fet que el mediador queda perfectament retintut a l'interior de la matriu polimèrica sense perdre's per dissolució durant el seu ús, juntament amb la disminució de la passivació de la superfície electròdica que habitualment té lloc durant l'oxidació del NADH, porten a mostrar la polisulfona com a un material molt prometedor en el disseny de biosensors basats en enzims deshidrogenases.

5.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ W. Itamar, K. Eugenii. *Angewandte Chemie, International Edition*, **39** (2000) 1180-1218
- ² F. Torabi, K. Ramanathan, P.-O. Larsson, L. Gorton, K. Svanberg, Y. Okamoto, B. Danielsson, M. Khayyami. *Talanta*, **50** (1999) 787-797
- ³ J. F. Rusling, R. J. Forster. *Journal of Colloid and Interface Science*, **262** (2003) 1-15
- ⁴ J.-C. Vidal, E. Garcia, J.-R. Castillo. *Analytical Sciences*, **18** (2002) 537-542
- ⁵ A. B. Florou, M. I. Prodromidis, M. I. Karayannis, S. M. Tzouwara-Karayanni. *Electroanalysis*, **12** (2000) 361-368
- ⁶ W. Li, Z. Wang, C. Sun, M. Xian, M. Zhao. *Analytica Chimica Acta*, **418** (2000) 225-232
- ⁷ H. T. Tien. *Journal of Physical Chemistry*, **88** (1984) 3172-3174
- ⁸ Z. Wu, B. Wang, S. Dong, E. Wang. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 143-147
- ⁹ H. T. Tien. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **15** (1986) 19-38
- ¹⁰ K. Asaka, A. Ottova, H. T. Tien. *Thin Solid Films*, **354** (1999) 201-207
- ¹¹ J.-J. Xu, D.-M. Zhou, H.-Y. Chen. *Electroanalysis*, **10** (1998) 713-716
- ¹² X. Yang, L. Hua, H. Gong, S. N. Tan. *Analytica Chimica Acta*, **478** (2003) 67-75
- ¹³ G. Robinson, D. Leech, M. R. Smyth. *Electroanalysis*, **7** (1995) 952-957
- ¹⁴ A. Vilkanauskyste, T. Erichsen, L. Marcinkeviciene, V. Laurinavicius, W. Schuhmann. *Biosensors & Bioelectronics*, **17** (2002) 1025-1031
- ¹⁵ P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. D. Pandey, I. Tiwari. *Sensors and Actuators*, **B62** (2000) 109-116
- ¹⁶ M. J. Batchelor, M. J. Green, C. L. Sketch. *Analytica Chimica Acta*, **221** (1989) 289-294
- ¹⁷ K. Hirano, H. Yamato, K. Kunitomo, M. Ohwa. *Biosensors & Bioelectronics*, **17** (2002) 315-122
- ¹⁸ L. Gorton, E. Csöregi, E. Dominguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson. *Analytica Chimica Acta*, **250** (1991) 203-248
- ¹⁹ M. Gerard, A. Chaubey, B. D. Malhotra. *Biosensors & Bioelectronics*, **17** (2002) 345-359
- ²⁰ C. A. Smolders, A. J. Reuvers, R. M. Boom, I. M. Wienk. *Journal of Membrane Science*, **73** (1992) 259-275
- ²¹ C. M. A. Brett, A. M. O. Brett. *Electrochemistry. Principles, methods and applications*. Oxford Science Publications (1993) pp 224-252
- ²² A. W. Bott. *Current Separations*, **11** (1992) 61-65

6 DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA QUIMIOSENSOR AMPEROMÈTRIC PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂: ÚS DE COMPOSITS BASATS EN XEROGELS AMB METALLS DISPERSOS

6.1 INTRODUCCIÓ

Amb l'objectiu de desenvolupar biosensors amperomètrics, s'ha vist que el primer pas és aconseguir un sistema de detecció reproduïble i suficientment sensible per a l'espècie electroactiva amb què es pretén fer el seguiment de la reacció. Els enzims *oxidoreductases*, pel fet d'ésser la classe d'enzims redox més nombrosa, permeten el desenvolupament de molts biosensors basats en la catàlisi de diversos compostos que implica l'ús del cofactor NADH, com ja s'ha vist pels enzims *deshidrogenases*, o de l'oxigen com a acceptor natural d'electrons, propi de les *flavoproteïnes oxidases*, una subclasse molt important dels enzims *oxidases*.^{1,2}

Atès que sovint el centre catalític de tots aquests enzims es troba molt ben protegit a l'interior de la proteïna, la interacció electrònica amb l'elèctrode és molt feble, de manera que els biosensors basats en enzims oxidoreductases mostren una transferència electrònica directa molt lenta. És per aquest motiu que, en general, no ha estat possible acoblar directament el centre redox dels enzims a la superfície electròdica. Només en el cas de l'enzim *peroxidasa de rave picant* (HRP), pel fet de ser un enzim de grandària molt petita, s'ha aconseguit establir comunicació directa entre el seu centre catalític i l'elèctrode.^{3,4,5} Com a resultat, clàssicament les reaccions catalitzades per enzims oxidoreductases s'han seguit en base a la mesura d'espècies electroactives solubles, ja sigui mitjançant l'augment de la concentració del producte format durant la reacció enzimàtica, o bé a través de la disminució de la concentració de substrat o cofactor.

Els enzims deshidrogenases dependents del cofactor NAD(P)⁺/NAD(P)H presenten diversos inconvenients alhora d'ésser incorporats en biosensors amperomètrics, els més importants dels quals s'han intentat solucionar amb el desenvolupament dels quimiosensors presentats en els capítols precedents. L'avantatge però d'aquests enzims, és que l'oxigen molecular no representa un factor limitant, ni tan sols una espècie interferent. D'altra banda, les flavoproteïnes oxidases, caracteritzades per tenir el cofactor *flavina adenina dinucleòtid* (FAD) fortament enllaçat, permeten l'avaluació de la velocitat global de reacció mitjançant el seguiment del consum d'oxigen⁶ o de la producció de peròxid d'hidrogen⁷, en els casos en què aquesta espècie apareix com a producte, estratègies que sovint impliquen alguns desavantatges. Una de les principals limitacions que mostren els sensors basats en enzims oxidases està directament relacionada amb la dificultat de fer un seguiment de la concentració d'oxigen com a conseqüència de la baixa pressió parcial d'aquest gas⁸ i la forta dependència que presenta la resposta dels biosensors desenvolupats respecte de les fluctuacions dels nivells d'oxigen. D'altra banda, una altra limitació prové dels elevats sobrepotencials necessaris per a dur a terme

L'oxidació o la reducció electroquímica del peròxid d'hidrogen format, quan el seguiment de la reacció es vol fer en base a la concentració d'aquest subproducte, que redueixen significativament la selectivitat atès que permeten l'oxidació d'altres espècies electroactives com els àcids ascòrbic, úric o el paracetamol entre d'altres, a aquests potencials. Aquests inconvenients representen una important restricció de l'ús pràctic dels elèctrodes basats en enzims oxidases. Ara bé, malgrat les dificultats exposades, la disponibilitat de l'oxigen als nivells necessaris per a dur a terme les reaccions enzimàtiques que impliquen enzims oxidases, representa un pas important en l'avenç cap a l'obtenció de biosensors compactes que no necessiten l'addició d'un cofactor. Aquesta mateixa disponibilitat ha dirigit la major part del treball realitzat amb enzims oxidases cap a la determinació del peròxid d'hidrogen que es forma en alguns casos, puix que així s'evita la dependència de l'oxigen ambiental. És per tot això que en aquest capítol es presenta l'estudi i desenvolupament d'un quimiosensor adreçat a assolir una determinació de l'oxidació del peròxid d'hidrogen reproducible i alhora suficientment sensible, que permeti treballar a uns potencials d'oxidació prou baixos com per evitar problemes relacionats amb una baixa selectivitat. Tanmateix, s'ha estudiat també la possibilitat de basar la detecció en la reducció del peròxid d'hidrogen, que habitualment és inviable degut a la dificultat que representa treballar a un potencial suficientment elevat com per què l'oxigen no es redueixi i només ho faci el peròxid d'hidrogen.

Algunes de les aproximacions dutes a terme en el desenvolupament de quimiosensors per a la determinació de peròxid d'hidrogen han estat l'ús de mediadors d'oxidació-reducció^{9,10,11} o d'altres espècies catalítiques, la incorporació d'enzims peroxidases^{12,13,14} o les modificacions químiques dels elèctrodes basades en deposicions metàl·liques^{15,16} sobre la seva superfície electròdica. No obstant això, en la majoria de casos no s'ha trobat una estratègia general que es pugui aplicar eficientment per a tots els enzims oxidases. En aquest sentit, la idea que aquí es presenta ha estat buscar nous materials que permetin modificar químicament els elèctrodes amb l'objectiu d'assolir una transferència electrònica heterogènia entre el peròxid d'hidrogen, que apareix com a producte de les reaccions en què els enzims cedeixen dos electrons a l'oxigen molecular, i el material electròdic. Això s'ha dut a terme mitjançant la incorporació de noves espècies amb caràcter catalític, de manera que el seguiment de la reacció s'ha fet en funció de la velocitat a la que s'oxida o es redueix aquesta nova espècie sobre la superfície electròdica.¹⁷

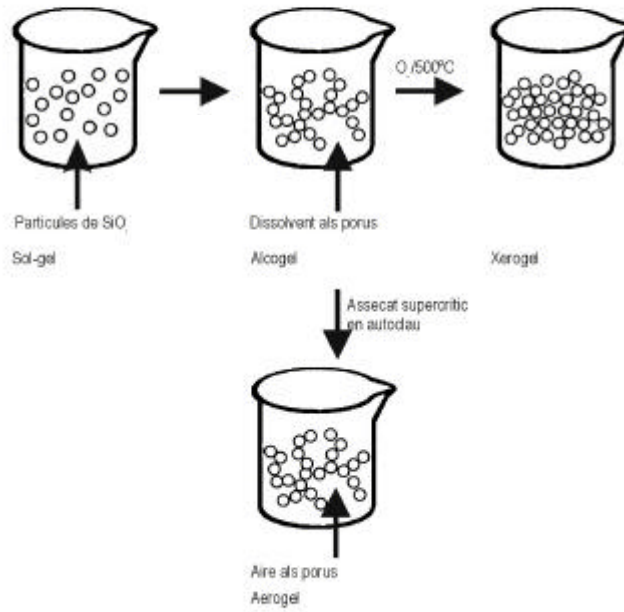
Un dels punts clau en el desenvolupament d'aquests materials catalítics és l'absència de pèrdues de les espècies que actuen com a catalitzadors, des del si de la matriu on es troben immobilitzades. Ja s'ha vist com aquest punt quedava resolt per al desenvolupament de quimiosensors per a la determinació de NADH basats en la incorporació de mediadors redox. En aquest capítol es mostra una alternativa basada en compòsits formats per xerogels amb metalls dispersos que s'han aplicat en el desenvolupament de quimiosensors per a la determinació de peròxid d'hidrogen.

Els materials derivats de *gels de sílice* es mostren com a matrius atractives per a la incorporació de diverses espècies, des de molècules orgàniques com enzims^{18,19}, anticossos^{20,21} o alguns mediadors redox^{22,23}, fins a compostos inorgànics com catalitzadors²⁴, polímers conductors²⁵ o metalls nobles^{26,27}. Aquest tipus de materials inorgànics són especialment apropiats per al desenvolupament de

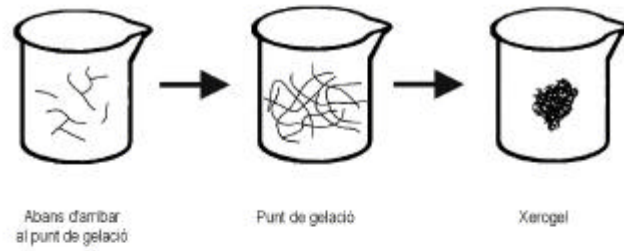
biosensors, com a conseqüència d'una sèrie de propietats relacionades amb la seva preparació i amb el seu comportament, que venen detallades a continuació. En primer lloc, el fet que es poden preparar sota condicions ambientals, sense necessitat d'ésser sotmesos a elevades temperatures, fa possible la incorporació de molt diverses espècies al seu interior, com ja s'ha comentat anteriorment, per a modificar químicament o biològica els elèctrodes emprats. Aquestes modificacions presenten l'avantatge addicional que suposa poder incorporar grans quantitats d'una espècie determinada sense necessitat de formar enllaços covalents que impliquen procediments molt més elaborats i complexos. Segons les condicions escollides per a la seva preparació, mostren una porositat modificable²⁸, que s'ha d'escollir de manera que asseguri la retenció de les molècules que es volen mantenir al seu interior, alhora que permeti l'accés de les espècies que han de reaccionar a l'interior del gel de sílice o sobre la superfície electròdica.²⁹ A més, són tèrmicament estables, químicament inerts i posseeixen una bona estabilitat mecànica.³⁰ A tot això cal afegir la simplicitat i versatilitat de la tècnica emprada per a la preparació de gels de sílice.^{31,32} De fet, la pròpia viscositat que posseeixen aquests materials, juntament amb la possibilitat que presenten d'ésser diluïts amb aigua, permet el seu processament com a monolits macroscòpics^{24,33,34} o com a membranes uniformes³⁵ de poc gruix, aplicables sobre superfícies electròdiques per al desenvolupament de nous sensors.³⁶

La tecnologia emprada per a la preparació de gels, iniciada a principis del segle XX, ha proporcionat matrius versàtils basades en òxids metàl·lics, organosiloxans o sílice.³⁷ Concretament, la preparació dels gels de sílice es basa en la polimerització d'un alcòxid de silici. La primera etapa consisteix en un procés d'hidròlisi que esdevé com a resultat de la mescla del precursor de sílice amb aigua en un dissolvent comú, que acostuma a ésser un alcohol com ara etanol. Així s'obté un producte intermedi amb grups silanol, que acabarà condensant en una segona etapa per formar el gel de sílice final, anomenat *hidrogel* en aquesta primera fase. Ambdós processos, hidròlisi i condensació, requereixen una catalisi àcida o bàsica, que donarà lloc a la formació de molècules més lineals o més ramificades respectivament. Les partícules col·loïdals que així es generen, s'enllacen per formar xarxes tridimensionals, fet que incrementa la viscositat durant el procés que es coneix com a gelació, que acaba formant un òxid porós hidratat que es coneix com a *alcogel*. A continuació, l'eliminació del dissolvent contingut a la xarxa porosa mitjançant la seva evaporació, origina el que s'anomena un *xerogel*. D'altra banda, si aquesta eliminació es fes via evacuació supercrítica, s'obtindria un *aerogel*.³⁸ A la Figura 6.1 s'il·lustra l'esquema seguit en la preparació d'un gel de sílice.

Procés de formació de gels de sílice



Catàlisi àcida



Catàlisi bàsica

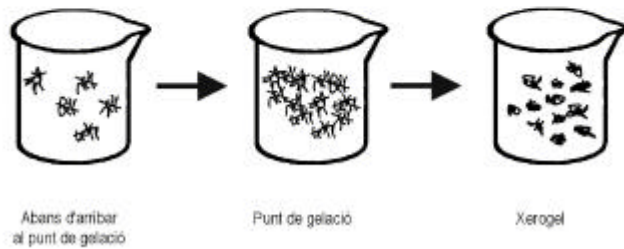


Figura 6.1: Procés general de formació dels diferents estats dels gels de sílice, amb detall dels xerogels obtinguts en funció del tipus de catàlisi emprada.

Malgrat que semblen ésser molts els avantatges relacionats amb l'ús dels gels de sílice com a matrius per a modificar químicament sensors, existeixen alguns inconvenients inherents al seu mateix procés de formació. Aquestes limitacions sovint es troben relacionades amb l'aparició d'esquerdes a les membranes formades sobre la superfície electròdica, l'absorció d'aigua i posterior inflament d'aquestes membranes, així com la presència d'una elevada concentració d'etanol al gel de sílice resultant, que pot ésser perjudicial per al material biològic que es vulgui retenir al seu interior. Molts han estat els intents adreçats a buscar solucions per a aquests problemes, per exemple amb l'ús de copolímers que eviten el trencament dels gels obtinguts³⁹, o bé l'eliminació de l'etanol amb l'ús d'un rotavapor⁴⁰. En aquest capítol, dirigit a desenvolupar un material catalític eficient per a la determinació de peròxid d'hidrogen, mitjançant l'ús de la tecnologia emprada per a la formació de gels de sílice, s'han preparat membranes basades en compòsits de xerogels modificats amb ferro, coure, ceri i zinc dispersos al seu interior. Addicionalment s'han incorporat altres components a les membranes: acetat de cel·lulosa com a agent emulsionant, que participa en el control per difusió, i polietilenglicol com a additiu per a ajudar en la dispersió del gel de sílice, en l'accessibilitat de la solució cap a l'interior de l'estructura porosa del gel i en la prevenció de la formació d'esquerdes a les membranes finals.

6.2 EXPERIMENTAL

6.2.1 APARELLS I REACTIUS

6.2.1.1 Aparells

Les mesures electroquímiques de tipus voltamperomètric, amperomètric i d'impedància, s'han realitzat amb el potenciostat descrit a § 2.2.1.1 en una cel·la voltamètrica de 15 ml de volum (VC2, BAS, U.S.). Tots els experiments s'han efectuat a temperatura ambient (25°C) amb un sistema convencional de tres elèctrodes, en què l'elèctrode de treball ha estat un elèctrode de platí (1.6 mm de diàmetre, BAS), el de referència un elèctrode de Ag/AgCl/3 M KCl (BAS) i l'auxiliar un fil de platí (BAS).

S'ha estudiat la morfologia de les membranes de compòsits basats en xerogels amb metalls dispersos mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat, així com la dispersió dels metalls continguts amb l'anàlisi per espectrometria d'energia dispersiva (EDS). Amb aquest objectiu, s'ha emprat un microscopi electrònic d'escombrat JEOL JSM-5600 per a l'estudi de microscòpia, mentre que l'anàlisi per EDS s'ha dut a terme amb un sistema de microanàlisi ISIS-300 (Oxford Instruments). Per a poder estudiar les mostres ha estat necessari fer un recobriment de la superfície exposada de les membranes amb una capa de 25 nm de Au/Pd mitjançant un *sputter-coater* Polaron SC7620 (Thermo VG Scientific).

L'estudi de la quantitat de metall present als gels amb zinc i coure, s'ha realitzat amb un analitzador voltamètric Tacussel, format per un mòdul polarogràfic TIPOL i un enregistrator EPL-1B. El sistema electròdic usat ha consistit en un elèctrode de treball de gota de mercuri, un calomelans saturat com a referència i un auxiliar de plati.

L'anàlisi de la distribució de les diferents grandàries de porus a l'interior dels gels de sílice s'ha realitzat amb un instrument Fisons Sorptomatic 1900.

Per últim, els estudis termogravimètrics i les anàlisis tèrmiques diferencials (TG-DTA) s'han efectuat amb un instrument Shimadzu DTG-60.

6.2.1.2 Reactius

Els precursors de sílice 3-aminopropiltrimetoxisilà (APTMS) i tetraetoxisilà (TEOS) són de la casa comercial Merck, i han estat emprats sense cap purificació prèvia. El peròxid d'hidrogen (30 % w/w), l'acetat de cel·lulosa (40% acetil), el polietilenglicol 650 (PEG) i l'àcid ascòrbic els ha subministrat Sigma. El Ce(NO₃)₃·xH₂O, el Cu(SO₄)·5H₂O, el FeCl₃·6H₂O i el ZnCl₂·xH₂O s'han comprat a la firma Riedel-de Haën.

S'ha preparat una solució stock de peròxid d'hidrogen aproximadament 0.2 M mitjançant la dilució apropiada de la solució concentrada comercial. Aquesta solució stock s'ha emmagatzemat a 4°C i s'ha estandarditzat volumètricament amb KMnO₄ cada setmana.

La resta de reactius emprats posseeixen un grau de qualitat *pro analysis* o similar i totes les solucions s'han preparat amb aigua bidestil·lada.

6.2 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN HIDROGELS DE SÍLICE AMB METALLS

Atès que són molts els treballs que han demostrat la idoneïtat dels gels de sílice com a matrius per a la incorporació de material biològic en el disseny de sensors amperomètrics, s'ha decidit treballar amb aquest tipus de material, amb l'objectiu d'obtenir gels modificats químicament que presentin propietats catalítiques adequades per al posterior desenvolupament de biosensors basats en enzims oxidases. La possibilitat de dissenyar els gels de sílice amb unes característiques adaptades a les necessitats requerides, mitjançant l'elecció adequada dels precursors, del tipus de catalisi i del dissolvent a emprar, ha portat a un procés de síntesi en què s'han combinat dos precursors, el TEOS, de caràcter fortament hidròfob, que s'usa freqüentment per a la preparació de gels totalment inorgànics, i l'APTMS, un compost hidròfil que, a més de proporcionar la compatibilitat necessària amb dissolvents aquosos degut a que redueix el número de grups silanol lliures a la superfície del gel, introdueix grups amino que poden ésser emprats per a la formació d'enllaços covalents amb altres molècules.^{41,42}

6.2.2.1 Síntesi de gels de sílice modificats amb metalls

La síntesi dels gels de sílice s'ha dut a terme mitjançant la mescla d'un precursor metàl·lic M, que pot ésser Ce^{4+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} o Zn^{2+} , amb APTMS en una proporció molar M:APTMS 1:1, a un baló de vidre amb 25 ml d'un dissolvent orgànic, que en aquest cas ha estat metanol o tetrahidrofurà. Amb l'objectiu d'obtenir una solució homogènia, s'ha deixat amb agitació contínua durant 1 hora a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'ha afegit TEOS, en diferents proporcions molars respecte de l'APTMS (1:0.5, 1:1 i 1:2, APTMS:TEOS), 1 ml d'aigua i 1 ml de catalitzador. S'han estudiat els gels obtinguts tant per a una catàlisi àcida amb àcid clorhídric, com per a una catàlisi bàsica amb una solució aquosa d'amoniac (25 % w/w).

6.2.2.2 Preparació i avaluació de membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls

Com a pas previ a la preparació dels quimiosensors, s'ha realitzat el poliment físic de l'elèctrode de treball amb Al_2O_3 sobre una tela de llana, després s'ha sotmès durant 3 minuts a l'ultrasons i, finalment, s'ha rentat, primer amb abundant aigua bidestil·lada i després amb etanol. Un cop obtingut el gel com a hidrogel i amb l'objectiu de poder dipositar-lo com a membrana sobre la superfície de l'elèctrode de platí, s'ha avaluat el comportament de diferents dilucions d'aquests hidrogels (1:1.5, 1:2.5 i 1:3.5, hidrogel: H_2O), així com de les mescles resultants amb acetat de cel·lulosa per a diferents proporcions (1:0.5, 1:1 i 1:2, hidrogel:acetat de cel·lulosa). L'estudi s'ha basat en l'avaluació de les propietats mecàniques, com la homogeneïtat i l'absència de fractures, i de la solubilitat de les membranes formades.

6.2.2.3 Caracterització electroquímica

L'avaluació dels corrents dels pics d'oxidació i reducció corresponents als voltamperogrames cíclics obtinguts en una solució de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.9 amb H_2O_2 2.5 mM, quan s'usa com a elèctrode de treball un elèctrode de platí recobert amb diferents membranes d'hidrogel, modificat amb metalls, i mesclat amb acetat de cel·lulosa, ha permès decidir quin ha estat el procediment de preparació òptim d'aquestes membranes, alhora que ha mostrat el caràcter catalític dels nous materials desenvolupats. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

6.2.2.4 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls

Atès que una de les característiques més valuoses en el desenvolupament de biosensors amperomètrics és el fet que responguin amb una elevada sensibilitat a l'espècie d'interès mentre que la seva resposta sigui nul·la o quasi nul·la a espècies que poden presentar un cert caràcter interferent, s'ha avaluat l'eficiència de membranes basades en hidrogels modificats amb metalls, com a barreres

difusionals a una determinada massa molecular que assegurí que espècies com els àcids ascòrbic (PM 176.2) i úric (PM 168.1) i compostos neutres com la dopamina (PM 151.2), no representin cap interferència en la determinació de peròxid d'hidrogen. En aquest sentit, s'ha calculat l'eficiència relativa, mesurada com la resposta per a una solució d'àcid ascòrbic 5 mM i de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, en comparació a la resposta que mostra una solució pura de peròxid d'hidrogen 2.5 mM donada com a 100%. Els valors de les intensitats de corrent emprades s'han extret dels voltamperogrames cíclics corresponents a les membranes, preparades per dilució o mescla amb acetat de cel·lulosa, dels hidrogels modificats amb metalls. Tanmateix, també s'ha comparat la resposta dels diferents quimiosensors en presència de solucions pures d'àcid ascòrbic, úric o de dopamina 5 mM, amb l'obtinguda per a una solució pura de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, de nou presa com a 100%.

6.2.2.5 Optimització del pH de la solució amortidora emprada

S'ha estudiat el comportament dels quimiosensors desenvolupats en funció del pH del tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M emprat com a solució amortidora. Aquest estudi s'ha realitzat en base a les mesures amperomètriques obtingudes com a resultat de l'addició de peròxid d'hidrogen fins a una concentració 5 mM quan s'està aplicant un potencial de treball de 0.65 V.

6.2.3 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN QUIMIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂ BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS

Si bé inicialment s'ha treballat amb hidrogels, l'observació d'una millora de les propietats mecàniques, així com d'un increment de la resistència química i de l'estabilitat tèrmica per als xerogels, com a conseqüència d'un entrecruament més efectiu i d'un augment de la densitat^{43,44} ha dirigit els estudis cap a possibles estratègies per a la preparació de membranes basades en xerogels.

6.2.3.1 Preparació i caracterització electroquímica de membranes basades en compòsits de xerogels amb metalls

Els hidrogels obtinguts seguint el procediment descrit a § 6.2.2.1 per a una proporció 1:1 dels dos precursors emprats, TEOS i APTMS, catalisi bàsica i metanol com a dissolvent, s'han deixat 2 hores més en agitació a temperatura ambient fins a la formació d'un sòlid. Aquest sòlid s'ha recuperat per filtració amb un filtre Whatman # 40, s'ha rentat primer amb etanol i després amb aigua i, finalment, s'ha assecat a 110°C durant 12 hores a fi d'obtenir el corresponent xerogel. Un cop realitzat el poliment físic dels elèctrodes de platí segons el procediment detallat a § 6.2.2.2, i amb l'objectiu de poder dipositar les membranes basades en xerogels sobre la seva superfície electròdica, s'han mesclat 2, 4 o 5 mg/ml dels sòlids obtinguts amb acetat de cel·lulosa a l'1 o 2 %, o bé amb diferents proporcions de polietilenglicol,^{45,46} de 0 a 40 % v/v respecte al volum de la solució polimèrica, o bé ambdós alhora.

Finalment, s'han dipositat 10 μl de la mescla final sobre la superfície electròdica, i s'han deixat assecat en un ambient sec fins a tenir una membrana ben formada.

Com a criteri de selecció de les membranes que confereixen un caràcter catalític òptim als quimiosensors desenvolupats per a la determinació de peròxid d'hidrogen, s'ha emprat la mesura del corrent extret dels pics d'oxidació i reducció dels corresponents voltamperogrames cíclics obtinguts en un medi de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.9 amb H_2O_2 2.5 mM, quan s'usa com a elèctrode de treball un elèctrode de platí recobert amb diferents membranes basades en compòsits de xerogel modificat amb metalls. En tots els casos la velocitat d'escombrat ha estat de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

6.2.3.2 Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat i avaluació de la concentració de metalls

Un cop preparades totes les mostres amb els corresponents recobriments d'or i pal·ladi, basades en xerogels sols, amb acetat de cel·lulosa, o bé amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, s'ha estudiat la seva morfologia per microscòpia electrònica d'escombrat a diferents augments, amb l'objectiu de poder explicar els comportaments electroquímics observats en base a l'estructura que posseeixen.

També s'ha analitzat la quantitat aproximada i la distribució de metall que es troba a la superfície externa de les membranes, mitjançant espectrometria d'energia dispersiva i anàlisis químiques posteriors, consistents en estudis polarogràfics per als xerogels amb zinc i coure, i en valoracions iodomètriques per retrocés per als xerogels amb ceri i ferro. Per als estudis polarogràfics, duts a terme a 25°C, s'ha emprat una cel·la electroquímica de 50 ml amb HCl 0.2 M, gelatina al 0.01 %, una gota d'una mescla electrolítica amb *n*-octanol i 10 mg de xerogel. Abans de fer les mesures, s'han desairejat les mostres amb nitrogen. La velocitat d'escombrat emprada ha estat de 150 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Per a cada mostra s'obté un corrent de difusió (i_d) degut a la reducció dels ions metàl·lics a l'estat d'amalgama, que és proporcional a la concentració d'ió metàl·lic. D'altra banda les valoracions iodomètriques s'han basat en la reacció entre els metalls i l'ió iodat (IO_3^-) per donar triiodur (I_3^-), que és l'espècie que es valora posteriorment amb una solució patró de tiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) 0.01 N. Les mostres a valorar s'han preparat amb 40 ml d'aigua, 10 ml HCl 6 N, 5 ml d'àcid acètic, 3 g de iodur de potassi i 10 mg de xerogel, i com a indicador s'ha emprat midó, afegit just abans del punt d'equivalència, moment que és possible detectar-lo visualment atès que correspon a la desaparició progressiva del color del triiodur.

6.2.3.3 Isotermes d'absorció-desorció de N_2

L'anàlisi de la distribució de les diferents grandàries de porus a l'interior dels xerogels preparats, així com el càlcul de l'àrea superficial, s'ha realitzat mitjançant la determinació de les isotermes d'absorció-desorció de nitrogen a 77 K. Com a pas previ a les mesures d'absorció-desorció, les mostres s'han desgasat a 50°C durant 12 hores, a una pressió de $5\cdot 10^{-2}$ mbar. La part de les isotermes corresponent a la desorció ha permès calcular la distribució de les grandàries de porus. Aquest paràmetre i l'àrea

superficial específica de la mostra s'han calculat mitjançant l'aplicació de l'equació de BET a la part lineal ($0.05 < P/P_0 < 0.30$) de la isoterma d'absorció.

6.2.3.4 Estudis termogravimètrics

Amb l'objectiu de conèixer el percentatge de pes dels xerogels que es perd per combustió mitjançant un escalfament continuat, corresponent als grups orgànics ancorats en els xerogels preparats, s'han dut a terme estudis termogravimètrics i anàlisis tèrmiques diferencials (TG-DTA), en un interval de 150 a 550°C, amb una velocitat d'escalfament de 10°C·min⁻¹ sota l'aplicació d'un flux d'aire de 50 cm³·min⁻¹.

6.2.3.5 Estudi dels coeficients de difusió

S'han calculat els coeficients de difusió aparents per a diferents compòsits basats en xerogels modificats amb ceri i altres sense modificar, en front a peròxid d'hidrogen i àcid ascòrbic, mitjançant estudis cronocoulombimètrics.^{47,48} Inicialment, s'ha d'esperar uns 30 minuts fins a assolir l'estabilització dels elèctrodes a avaluar. Després, es trien dos potencials entre els quals es troba el potencial de reducció corresponent a l'espècie avaluada, quan s'usa com a elèctrode de treball cadascun dels elèctrodes que volem estudiar. En aquest cas, el potencial s'ha incrementat des d'un valor de -0.6 V (E_i) fins a 0.3 V (E_s) per a peròxid d'hidrogen i 0.6 V (E_s) per a àcid ascòrbic i, finalment, s'ha tornat al valor inicial E_i.

6.2.3.6 Espectroscòpia d'impedàncies

Mitjançant mesures d'impedància s'ha estudiat la conductivitat de diferents membranes basades en compòsits de xerogels amb acetat de cel·lulosa, sense modificar i modificats amb metalls, així com l'efecte que té l'addició de polietilenglicol als compòsits sobre la resistència total que presenten aquestes membranes. Inicialment, s'han mesurat les impedàncies reals (Z') en funció del potencial, en un interval que va de -0.2 V fins a 0.6 V vers un elèctrode de referència de Ag/AgCl/3 M KCl, quan la cel·la electroquímica conté també fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 7.0. Atès que dels voltamperogrames cíclics obtinguts prèviament es dedueix que en l'interval de 0.1 V a 0.3 V no hi ha reacció faradaica, el sistema electroquímic format per l'elèctrode de platí recobert amb una membrana basada en un compòsit amb xerogel es pot representar com a un circuit RC, que inclou la resistència de la membrana i la capacitat de la doble capa. Atès que interessa poder calcular la resistència de la membrana, s'han realitzat totes les mesures d'impedància a una freqüència de 20 kHz (l'amplitud del voltatge de l'ona sinusoidal ha estat de 10 mV), amb la qual s'assegura la supressió de la contribució de la capacitat a la impedància total, de manera que el valor d'aquesta es pot atribuir majoritàriament a la resistència que es vol conèixer.

D'altra banda, en base als estudis realitzats per *Sampath i Lev*⁴⁹, en què es descriu amb detall la relació entre la superfície accessible a la solució aquosa i la hidrofobicitat de les membranes, es mostra la possibilitat d'emprar la capacitat com a una mesura semiquantitativa de la part de la membrana a la qual pot accedir la solució aquosa. Amb l'objectiu de calcular la capacitat de les membranes avaluades, s'han enregistrat els gràfics de *Bode*, que mostren la freqüència en funció de l'angle de desfasament entre voltatge i intensitat. En aquest cas, s'ha avaluat la component del corrent altern (AC) a un angle de 90° de desfasament, quan la freqüència és de 80 Hz, amb l'aplicació de diferents potencials de corrent continu (DC) en un interval de -0.6 a 0.6 V.

6.2.3.7 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en compòsits de xerogels amb metalls

Per confirmar que la quasi absència d'efecte interferent, quan es treballa amb hidrogels mesclats amb acetat de cel·lulosa, es pot estendre a l'ús de compòsits basats en xerogels amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, s'han comparat les intensitats extrems dels voltamperogrames cíclics per a una solució d'àcid ascòrbic 2.5 mM, obtingudes quan es treballa amb dos quimiosensors diferents. Els dos quimiosensors avaluats han estat, un quimiosensor preparat amb una membrana basada en un xerogel modificat amb ceri, mesclat amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, i un quimiosensor preparat amb una membrana basada en la dilució d'un hidrogel modificat amb ceri.

6.2.3.8 Optimització del pH de la solució amortidora emprada

Amb l'objectiu de determinar el pH òptim de la solució de fosfat 0.05 M amb KCl 0.05 M, emprada com a solució amortidora, s'han avaluat, per als diferents quimiosensors basats en compòsits amb xerogels, els increments de la intensitat de corrent que es generen, quan s'està aplicant un potencial de 0.65 V, com a conseqüència de l'oxidació del peròxid d'hidrogen addicionat a la cel·la electroquímica fins a assolir una concentració final 5 mM. L'interval de pH avaluat va de 5 a 9.

6.2.3.9 Estudi de la resposta amperomètrica a H₂O₂

Un cop demostrat el caràcter catalític dels nous materials desenvolupats, s'han estudiat les característiques analítiques que se'n deriven quan s'empren en la preparació de quimiosensors per a la determinació de peròxid d'hidrogen, mitjançant l'avaluació de paràmetres com la sensibilitat, els intervals de resposta lineal, els límits de detecció i la reproductibilitat associada a les mesures. S'ha aplicat un potencial de 0.65 V, per a l'oxidació, i de -0.2 V, per a la reducció, a una cel·la electroquímica que contenia 15 ml de tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.9 en agitació contínua. Un cop assolit l'estat estacionari, les mesures amperomètriques s'han obtingut de les addicions de microvolums de solucions de peròxid d'hidrogen de concentració coneguda.

6.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.3.1 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ DE MEMBRANES BASADES EN HIDROGELS DE SÍLICE AMB METALLS

6.3.1.1 Síntesi de gels de sílice modificats amb metalls

Les primeres síntesis de gels de sílice modificats amb metalls es van realitzar només amb Fe³⁺ com a precursor metàl·lic. Inicialment, es va treballar amb un sol precursor de sílice, l'APTMS, però els gels obtinguts van resultar ésser massa hidrofílics, de manera que la seva retenció com a membrana sobre la superfície electròdica es veia dificultada en gran mesura. A continuació es va incorporar un segon precursor de sílice, el TEOS, que proporcionava el caràcter hidrofòbic necessari al gel per a poder assegurar una pèrdua de membrana per dissolució quasi nul·la. El problema però va aparèixer amb la manca d'homogeneïtat assolida pels gels sintetitzats. Per això es van emprar diferents proporcions molars d'APTMS:TEOS, per a una proporció constant de M:APTMS igual a 1:1. Quan la proporció APTMS:TEOS era igual a 1:0.5, els gels formats eren massa solubles, mentre que per a una relació 1:2, eren molt densos, fet que dificultava la seva aplicació sobre la superfície electròdica. Així s'arribà a una proporció òptima igual a 1:1, en què els gels resultants eren suficientment homogenis, alhora que no eren ni massa hidrofílics com per perdre's per dissolució, ni massa hidrofòbics com per evitar l'accés de la solució de treball. En relació als dissolvents orgànics emprats, metanol o tetrahidrofurà, es decidí treballar amb metanol, atès que el tetrahidrofurà generava dues fases immiscibles que impedièn la síntesi normal dels gels. Per últim, el tipus de catalisi escollit va ser la bàsica amb NH₃, ja que tot i conferir certa rigidesa als gels formats, evita la solubilitat pròpia dels gels preparats amb HCl com a catalitzador, possiblement deguda als temps d'envelliment molt més llargs per a aquests darrers gels, que apareixen indicats a la bibliografia.^{41,42} A la Figura 6.2, on es mostra l'esquema global per a la reacció de formació d'hidrogels que s'ha seguit, s'observa com inicialment es formen enllaços covalents entre els metalls i els grups amino de les molècules del precursor APTMS, que generen un nucli hidrofílic que posteriorment condensa amb molècules de TEOS per a formar una xarxa porosa de caràcter més hidrofòbic.

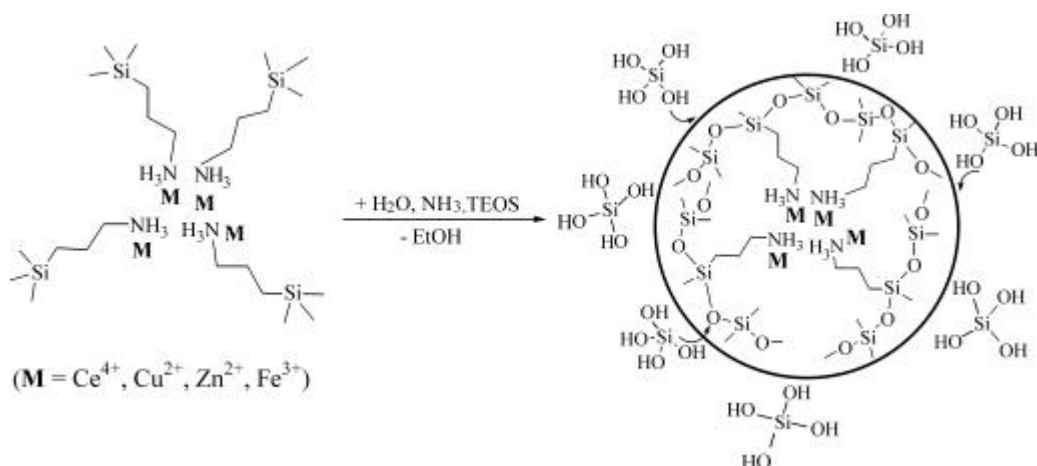


Figura 6.2: Esquema global de la reacció amb què s'obté com a producte un hidrogel, basat en els precursors APTMS i TEOS, modificat amb diferents metalls (M).

6.3.1.2 Preparació i avaluació de membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls

Com a continuació del procés d'optimització de la preparació de les membranes basades en hidrogels que s'han d'aplicar sobre la superfície dels elèctrodes de platí, s'ha treballat ara amb hidrogels modificats amb Fe^{3+} , sintetitzats amb una relació de proporcions M:APTMS:TEOS igual a 1:1:1, en metanol i catàlisi bàsica. L'hidrogel obtingut no mostra les característiques adequades per a ésser aplicat sobre la superfície electròdica, de manera que s'ha estudiat la seva dilució i la seva mescla amb acetat de cel·lulosa. Les dilucions avaluades han estat 1:1.5, 1:2.5 i 1:3.5, hidrogel:H₂O, però tan sols la corresponent a la proporció 1:2.5 ha restat estable un cop aplicada sobre la superfície de l'elèctrode de platí, mentre que les altres dues s'han perdut per dissolució. Per tant, s'han preparat la resta d'hidrogels modificats amb els diferents metalls i s'han diluït segons aquesta proporció òptima. D'altra banda, totes les mescles amb acetat de cel·lulosa estudiades (1:0.5, 1:1 i 1:2, hidrogel:acetat de cel·lulosa al 4 %), han mostrat ser més estables i homogènies que les dilucions, especialment les obtingudes per a les proporcions 1:0.5 i 1:1, si bé s'ha escollit per a treballs posteriors la relació 1:1. La Taula 6.1 inclou les propietats mecàniques i la solubilitat de les membranes formades amb els hidrogels sintetitzats amb cadascun dels precursors metàl·lics emprats, quan s'utilitzen el factor de dilució més adequat (1:2.5) i diferents proporcions per a la mescla amb acetat de cel·lulosa.

Taula 6.1: Avaluació de la resistència mecànica i la solubilitat de les membranes basades en hidrogels modificats amb diferents metalls, diluïts o mesclats amb acetat de cel·lulosa. La dilució emprada ha estat igual a 1:2.5 per a la relació hidrogel:H₂O en tots els casos presentats, mentre que s'han avaluat diferents proporcions d'hidrogel:acetat de cel·lulosa, indicades a la taula.

| CONFIGURACIÓ ELECTRÒDICA | RESISTÈNCIA MECÀNICA | SOLUBILITAT |
|---|----------------------|---------------|
| Pt / Fe-hidrogel amb dilució 1:2.5 | Baixa | Elevada |
| Pt / Cu-hidrogel amb dilució 1:2.5 | Baixa | Elevada |
| Pt / Zn-hidrogel amb dilució 1:2.5 | Molt baixa | Força elevada |
| Pt / Ce-hidrogel amb dilució 1:2.5 | Molt baixa | Força elevada |
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:0.5 | Bona | Insoluble |
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | Molt bona | Insoluble |
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:2 | Molt bona | Insoluble |
| Pt / Cu-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | Molt bona | Insoluble |
| Pt / Zn-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | Molt bona | Insoluble |
| Pt / Ce-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | Molt bona | Insoluble |

6.3.1.3 Caracterització electroquímica

La Taula 6.2 mostra els valors dels corrents dels pics d'oxidació i reducció i els potencials anòdic i catòdic òptims, deduïts dels corresponents voltamperogrames cíclics, per a elèctrodes de platí recoberts amb diferents membranes d'hidrogel, modificat amb metalls, mesclat amb acetat de cel·lulosa, quan la cel·la electroquímica conté tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M a pH 6.9 amb H₂O₂ 2.5 mM. No s'inclouen les dades per als elèctrodes modificats amb hidrogels diluïts atès que, tal com s'ha indicat a l'apartat anterior, aquestes membranes han demostrat ser massa inestables per a poder fer aquest tipus de mesures.

La comparació dels valors d'intensitat de corrent obtinguts respecte a la quasi absència de pics per a elèctrodes modificats amb el mateix tipus de membranes basades en la mescla d'hidrogels, però sense modificar amb metalls, i acetat de cel·lulosa en les mateixes proporcions, demostra el caràcter catalític dels nous materials desenvolupats.

Taula 6.2: Valors dels corrents catalítics i dels potencials anòdic i catòdic obtinguts per a elèctrodes de treball basats en elèctrodes de platí modificats amb membranes d'hidrogels amb metalls, mesclats amb acetat de cel·lulosa, quan es treballa amb una cel·la electroquímica que conté peròxid d'hidrogen 2.5 mM. Tots els càlculs s'han fet per n= 3.

| CONFIGURACIÓ ELECTRÒDICA | INTENSITAT DEL PIC ANÒDIC DE CORRENT CATALÍTIC (μ A) | POTENCIAL ANÒDIC DE CORRENT CATALÍTIC (V) | INTENSITAT DEL PIC CATÒDIC DE CORRENT CATALÍTIC (μ A) | POTENCIAL CATÒDIC DE CORRENT CATALÍTIC (V) |
|---|---|---|--|--|
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:0.5 | 0.9 | 0.75 | 42 | 0.01 |
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | 1.9 | 0.67 | 88 | 0.03 |
| Pt / Fe-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:2 | 4.9 | 0.75 | 27 | 0.01 |
| Pt / Cu-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | 5.4 | 0.64 | 48 | -0.09 |
| Pt / Zn-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | 3.4 | 0.51 | 85 | -0.07 |
| Pt / Ce-hidrogel amb acetat de cel·lulosa 1:1 | 3.8 | 0.67 | 22 | -0.07 |

6.3.1.4 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en hidrogels de sílice amb metalls

A la Taula 6.3 s'inclouen els valors d'eficiència relativa per a la mesura del corrent d'una solució d'àcid ascòrbic i peròxid d'hidrogen amb els sensors desenvolupats, en comparació a la resposta quan la solució només conté peròxid d'hidrogen. Tanmateix també es mostra la relació de les respostes dels diferents quimiosensors en presència de solucions pures d'àcid ascòrbic, úric o de dopamina, en comparació als corrents mesurats per a una solució pura de peròxid d'hidrogen. En ambdós casos el 100 % correspon a una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM.

De les mesures d'eficiència relativa obtingudes, resulta evident que la presència d'acetat de cel·lulosa a les membranes d'hidrogel confereix el caràcter de barrera de difusió molecular esperat.^{50,51,52} A més, es demostra l'absència d'efecte interferent per part d'espècies interferents típiques en mostres reals, com són els àcids ascòrbic, úric i la dopamina, car la presència d'aquests compostos, a les concentracions esmentades, com a màxim incrementa la resposta a peròxid d'hidrogen en un 4 %.

Taula 6.3: Eficiència relativa de la mesura del corrent degut a l'oxidació de peròxid d'hidrogen 2.5 mM en presència d'àcid ascòrbic 5 mM, i respostes relatives per a solucions d'àcid ascòrbic, úric i de dopamina pures 5 mM en relació al 100 % corresponent a la mesura per a una solució pura de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, quan es treballa amb elèctrodes de platí recoberts amb membranes basades en hidrogels modificats amb diferents metalls, diluïts o mesclats amb acetat de cel·lulosa (AC). La dilució emprada ha estat igual a 1:2.5 per a la relació hidrogel:H₂O, mentre que s'han avaluat diferents proporcions d'hidrogel:AC, indicades a la taula. Tots els càlculs s'han fet per n= 3.

| CONFIGURACIÓ ELECTRÒDICA | EFICIÈNCIA RELATIVA (%) | EFECTE INTERFERENT DEGUT A SOLUCIONS PURES (5 mM) | | |
|------------------------------------|-------------------------|---|-----------|----------|
| | | ÀCID ASCÒRBIC | ÀCID ÚRIC | DOPAMINA |
| Pt / Fe-hidrogel amb dilució 1:2.5 | 175 | -- | -- | -- |
| Pt / Cu-hidrogel amb dilució 1:2.5 | 176 | -- | -- | -- |
| Pt / Zn-hidrogel amb dilució 1:2.5 | 180 | -- | -- | -- |
| Pt / Ce-hidrogel amb dilució 1:2.5 | 195 | -- | -- | -- |
| Pt / Fe-hidrogel amb AC 1:0.5 | 115 | -- | -- | -- |
| Pt / Fe-hidrogel amb AC 1:1 | 103 | 2 | 1 | 4 |
| Pt / Fe-hidrogel amb AC 1:2 | 101 | -- | -- | -- |
| Pt / Cu-hidrogel amb AC 1:1 | 104 | -- | -- | -- |
| Pt / Zn-hidrogel amb AC 1:1 | 102 | 3 | 1 | 4 |
| Pt / Ce-hidrogel amb AC 1:1 | 102 | 3 | 0 | 2 |

6.3.1.5 Optimització del pH de la solució amortidora emprada

S'ha fet un estudi del pH òptim del tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M, emprat com a solució amortidora, quan es treballa amb un elèctrode de platí modificat amb membranes basades en hidrogels com a elèctrode de treball. Només s'han avaluat les mesures amperomètriques obtingudes de l'addició de peròxid d'hidrogen amb els elèctrodes modificats amb l'hidrogel amb ferro diluït i amb cadascun dels hidrogels, amb els diferents metalls, mesclats amb acetat de cel·lulosa, excepte per al de ceri, atès que ha mostrat un comportament anòmal que ha impedit el seu ús continuat per a la realització de tot l'estudi. La Figura 6.3 recull el perfil d'intensitats de corrent obtingut envers el pH de la solució amortidora.

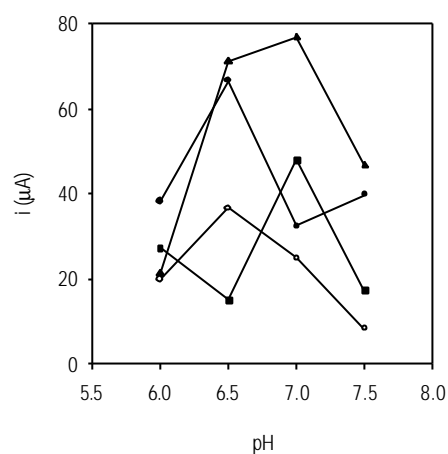


Figura 6.3: Estudi de la intensitat de corrent mesurada per a una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM en funció del pH de la solució amortidora, quan es treballa amb elèctrodes de platí modificats amb membranes basades en hidrogels diluïts, modificats amb ferro, (?) o amb hidrogels mesclats amb acetat de cel·lulosa, modificats amb ferro (?), coure (■) o zinc (?). El potencial de treball emprat ha estat 0.65 V.

El pH òptim de la solució tampó per als elèctrodes modificats amb hidrogels amb ferro ha estat 6.5, tant si les membranes es preparen per dilució, com amb acetat de cel·lulosa. En canvi, els elèctrodes preparats amb hidrogels mesclats amb acetat de cel·lulosa, tant si estan modificats amb coure com amb zinc, han mostrat un comportament òptim quan el pH de la solució amortidora ha estat 7.0. Aquests resultats es veuen clarament representats a la Figura 6.4, que inclou els voltamperogrames cíclics obtinguts per als elèctrodes assajats, quan es treballa amb una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM al pH òptim, per a cadascun d'ells, a la cel·la electroquímica. En aquests gràfics es compara el comportament dels elèctrodes preparats amb membranes basades en hidrogels modificats amb metalls, amb l'obtingut per a elèctrodes amb membranes que s'han preparat de la mateixa manera però amb els corresponents hidrogels sense metalls. Per tant, esdevé palès el caràcter catalític mostrat pels elèctrodes recoberts amb hidrogels modificats amb metalls.

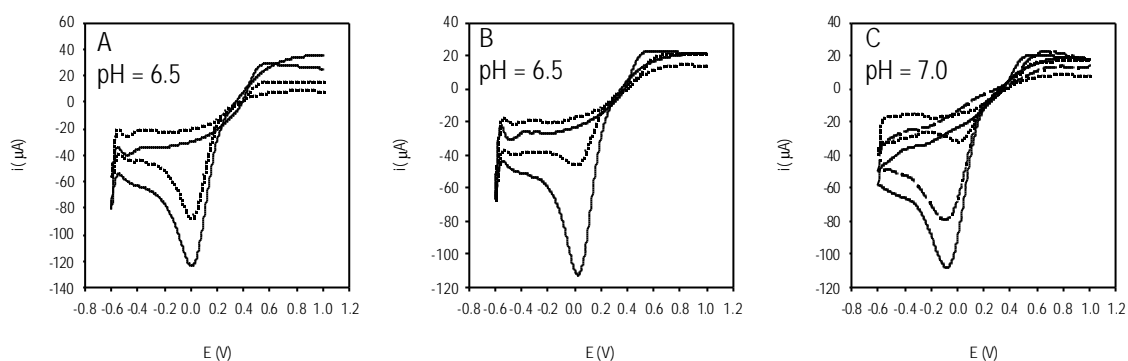


Figura 6.4: Voltamperogrames cíclics corresponents a una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, quan es treballa amb elèctrodes recoberts amb membranes basades en hidrogels diluïts (A) o mesclats amb acetat de cel·lulosa (B). En tots els casos, els voltamperogrames representats amb línies de punts corresponen a elèctrodes amb hidrogels sense metalls, mentre que la línia discontinua a (C) és per a un elèctrode amb hidrogel modificat amb coure, i la línia contínua va associada a elèctrodes preparats amb hidrogels modificats amb ferro (A) i (B), o amb zinc (C). Velocitat d'escombrat: 50 mV·s⁻¹.

6.3.2 DESENVOLUPAMENT I CARACTERITZACIÓ D'UN QUIMIOSENSOR PER A LA DETERMINACIÓ DE H₂O₂ BASAT EN MEMBRANES AMB COMPÒSITS DE XEROGELS AMB METALLS

6.3.2.1 Preparació i caracterització electroquímica de membranes basades en compòsits de xerogels amb metalls

Un cop obtinguts els xerogels modificats amb metalls, s'han mesclat amb diferents components amb l'objectiu d'obtenir membranes fàcilment aplicables sobre la superfície dels elèctrodes de platí. Inicialment, s'ha comprovat que es poden homogeneïtzar correctament quan s'addicionen a una solució d'acetat de cel·lulosa. A més, la solució viscosa resultant presenta unes bones característiques d'adherència sobre la superfície electròdica. Ara bé, els primers assajos electroquímics realitzats amb els elèctrodes preparats amb aquestes membranes per a la determinació de peròxid d'hidrogen, han mostrat una clara absència de resposta electroquímica que demostra que els metalls no poden actuar en aquest cas com a catalitzadors. Poden ésser moltes les causes d'aquest comportament, com ara una manca de conductivitat de les membranes, una difusió limitada de l'analit a través d'elles, la dificultat d'hydratació o bé la combinació de totes aquestes hipòtesis. Amb els experiments duts a terme posteriorment, s'ha intentat elucidar quins han estat els motius reals per a l'obtenció dels resultats esmentats. D'altra banda, s'han avaluat les membranes preparades amb els xerogels incorporats en polietilenglicol. En aquest cas també s'han obtingut membranes homogènies, si bé aquestes han mostrat una adherència defectuosa sobre la superfície electròdica. Per últim, les membranes basades en mesclades d'acetat de cel·lulosa i polietilenglicol amb xerogels dispersos al seu interior, han estat les

que han ofert les millors característiques pel que fa a homogeneïtat, adherència a la superfície electròdica i comportament electroquímic. La Figura 6.5 correspon a l'estudi realitzat per a l'optimització de la quantitat de polietilenglicol incorporat a les mescles d'acetat de cel·lulosa al 2 % amb 5 mg/ml de xerogel, en aquest cas el que ha estat modificat amb ceri. Els voltamperogrames cíclics representats per a mostres que incorporen diferents percentatges de polietilenglicol, permeten concloure que les membranes preparades amb un 20 % de polietilenglicol, respecte al volum total de la solució polimèrica, són les que posseeixen un caràcter catalític més evident. Percentatges inferiors mostren pics d'intensitat de corrent més petits, fet que pot ésser conseqüència directa d'una menor conductivitat quan només hi ha acetat de cel·lulosa, de què la capacitat de catàlisi es troba afavorida en presència de polietilenglicol, o bé d'una combinació d'ambdós arguments. Tanmateix, per percentatges superiors també s'observa una disminució del corrent catalític, que en aquest cas probablement troba explicació en què s'està reduint cada cop més la concentració de metall actiu, contingut als xerogels, en la solució global amb què s'han de formar les membranes.

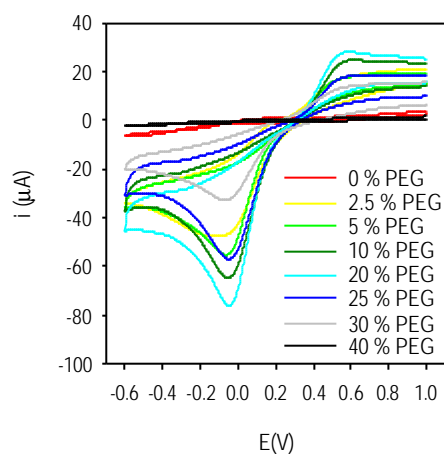


Figura 6.5: Voltamperogrames cíclics corresponents a una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, quan es treballa amb elèctrodes recoberts amb membranes basades en un xerogel, modificat amb ceri, mesclat amb acetat de cel·lulosa al 2 % i amb diferents percentatges de polietilenglicol respecte al volum de la solució polimèrica. Velocitat d'escombrat: 50 mV·s⁻¹.

6.3.2.2 Estudi morfològic mitjançant microscòpia electrònica d'escombrat

La Figura 6.6 mostra les micrografies obtingudes amb el microscopi electrònic d'escombrat per als 4 xerogels modificats amb zinc, ferro, coure i ceri. Quan s'estudia la morfologia d'un xerogel sense metalls, preparat seguint la mateixa ruta sintètica, s'observen partícules compactes relativament grans. En canvi, ara es pot veure com els xerogels modificats amb ferro i coure estan formats per agregats de partícules que poden aparèixer compactats en algunes zones o més laxos en altres punts. Aquests

agregats més laxos formen cercles que, quan s'observen amb més augments apareixen com a partícules condensades de forma irregular que formen una estructura amb una distribució heterogènia de grandàries. Però, la major part del xerogel està format per agregacions més compactes formades per partícules petites. Aquesta estructura és en gran mesura resultat de la separació de fases que provoca la presència del precursor TEOS que no ha estat hidrolitzat, malgrat la proporció elevada d'aigua en relació al compost TEOS ($H_2O:TEOS$, 10:1). D'altra banda, els xerogels modificats amb zinc i ceri es caracteritzen per l'empaquetament compacte d'agregats de petites partícules esfèriques d'entre 500 i 300 nm.

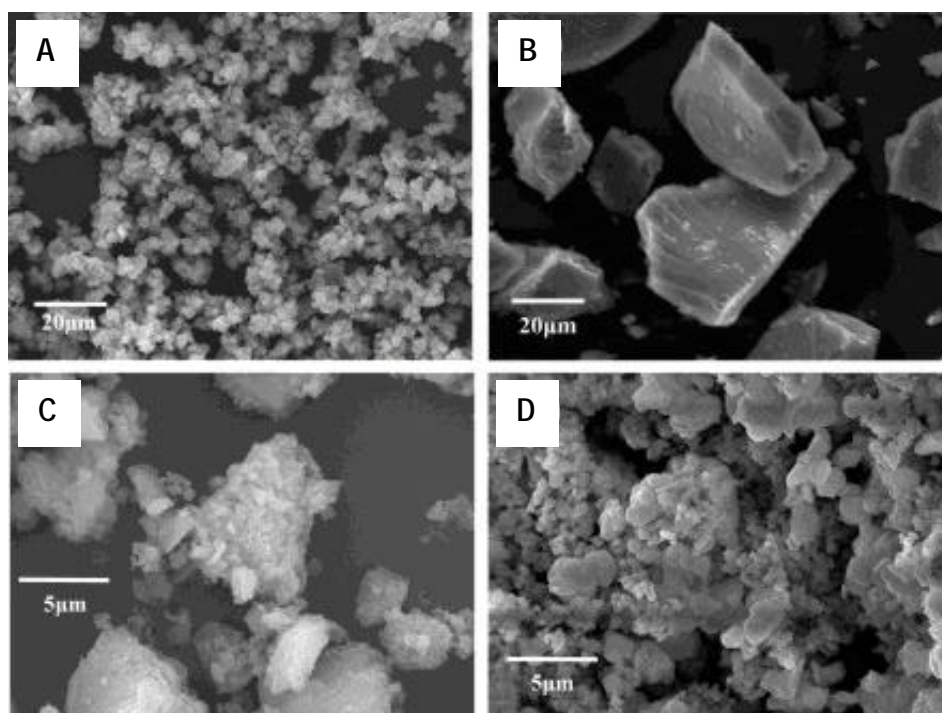


Figura 6.6: Micrografies obtingudes per microscòpia electrònica d'escombrat, dels xerogels modificats amb zinc (A), ferro (B), coure (C) i ceri (D).

Pel que fa a les membranes basades en la mescla dels xerogels modificats amb metalls amb acetat de cel·lulosa, amb o sense polietilenglicol, resulta ésser un paràmetre molt important la distribució de les partícules de xerogel per tota la membrana, atès que una distribució regular i homogènia garanteix que es produeixi un elevat nombre de col·lisions entre les molècules d'analit i els centres catalítics. La Figura 6.7 permet comparar aquesta distribució per a membranes preparades amb un xerogel modificat amb ferro, quan s'han preparat només amb acetat de cel·lulosa al 2 %, o quan a més s'ha addicionat un 20 % de polietilenglicol. És molt important destacar com el polietilenglicol contribueix de forma

eficient a assolir una distribució molt més regular del xerogel a l'interior de la membrana, factor que és de importància cabdal per a obtenir un millor accés als centres catalítics.

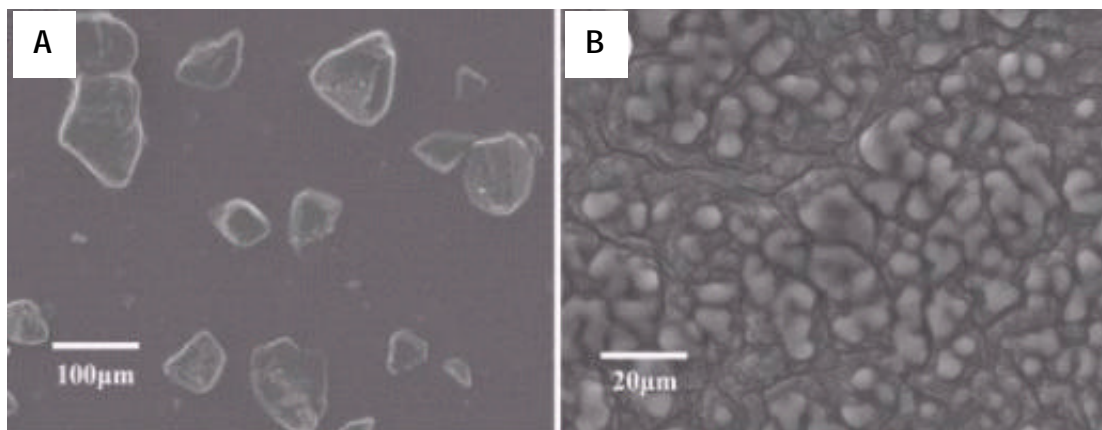


Figura 6.7: Micrografies obtingudes per microscòpia electrònica d'escombrat, de membranes basades en la mescla d'un xerogel modificat amb ferro, amb acetat de cel·lulosa al 2 % (A) o amb acetat de cel·lulosa al 2 % i un 20 % de polietilenglicol respecte al volum total de la solució polimèrica (B).

S'ha emprat l'anàlisi per espectrometria d'energia dispersiva per fer una estimació aproximada de la quantitat de metall que es troba a la superfície externa dels xerogels estudiats. Les imatges incloses a la Figura 6.8 demostren que hi ha una excel·lent dispersió dels metalls sobre la superfície de les partícules, excepte per al cas del xerogel modificat amb coure, en què es troben partícules de $\text{Cu}(\text{OH})_x\text{O}_y$ sobre la matriu de sílice. La dispersió dels metalls pot ésser atribuïda als grups amino del precursor APTMS, atès que aquests permeten l'enllaç amb els metalls, fet que evita la formació de conglomerats de metalls. En canvi, per al xerogel amb coure apareixen conglomerats de coure que poden ser deguts a l'efecte del catalitzador bàsic emprat, en aquest cas NH_3 , sobre els enllaços Si-Cu, que origina la formació del complex soluble $[\text{Cu}(\text{NH}_3)]^{2+}$ que, posteriorment, és dèbilment adsorbit o atrapat a la matriu de sílice durant el procés de policondensació del gel.

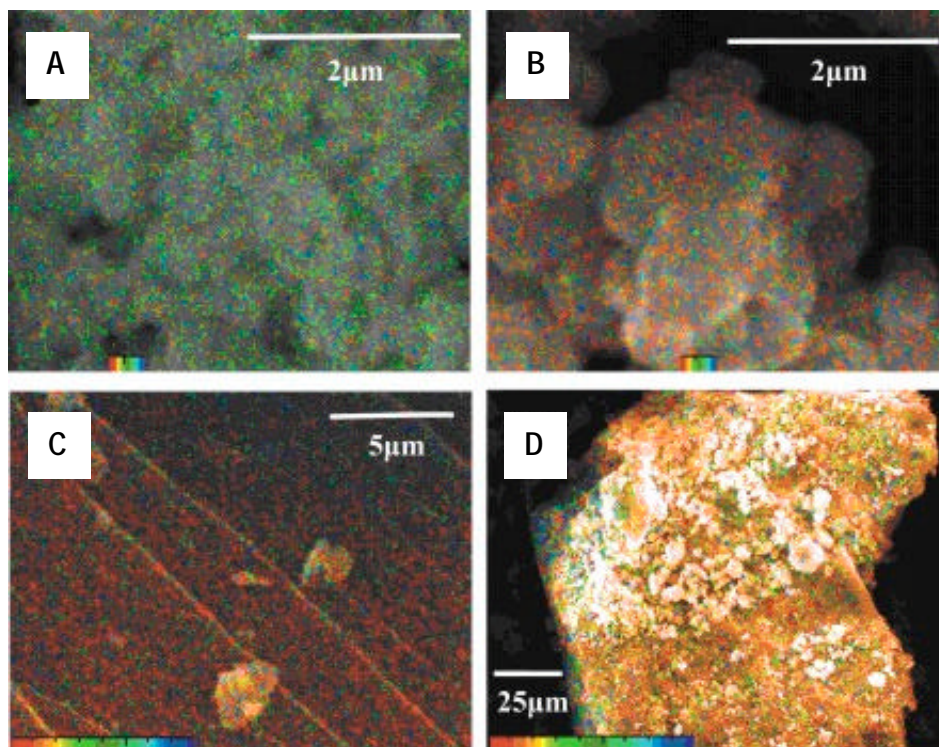


Figura 6.8: Imatges de l'anàlisi per espectrometria d'energia dispersiva dels xerogels modificats amb ceri (A), zinc (B), ferro (C) i coure (D) (vegeu Annex B). Els pics de raigs X característics són: Si, 1.74 keV; Zn, 8.63 / 1.01 keV; Ce, 4.84 / 0.88 keV; Cu, 8.04 / 0.93 keV; Fe, 6.40 / 0.70 keV. Interval d'energia corresponents per a les escales de color: 4.40-6.00 keV (A); 8.40-10.00 keV (B); 0.20-8.00 keV (C); 0.20-9.00 keV (D).

La Taula 6.4 inclou els valors per a les concentracions superficial i total de metall als xerogels estudiats. Cada valor prové de la mitjana de tres mesures, i per a tots els casos la desviació estàndard relativa es troba en l'interval de 0.2 a 1 %. S'observa com els xerogels amb ceri, zinc i ferro, presenten quasi una tercera part del contingut total de metall a la superfície de les partícules, mentre que la resta de metall es troba probablement encapsulat a l'interior de la matriu de sílice. En canvi, el cas del xerogel modificat amb coure és força diferent, atès que pràcticament el 80 % de la concentració total de metall apareix concentrada a la capa més externa de les partícules de gel.

És important destacar la importància que té el fet que hi hagi una gran quantitat de centres metàl·lics en l'augment de la velocitat electrocatalítica, en comparació a la situació que es tindria amb una monocapa, on es disposaria de molts menys centres catalítics i, per tant, el seu efecte electrocatalític seria inferior.

Taula 6.4: Concentracions superficial i total de metalls en els diferents xerogels estudiats. La concentració superficial s'ha determinat per espectrometria d'energia dispersiva, mentre que la concentració total s'ha avaluat mitjançant anàlisis polarogràfiques o valoracions iodomètriques, segons el metall contingut al xerogel. Tots els càlculs s'han realitzat per a n= 3.

| TIPUS DE XEROGEL | CONCENTRACIÓ SUPERFICIAL (%) | CONCENTRACIÓ TOTAL (%) | | RELACIÓ DE LES CONCENTRACIONS SUPERFICIAL / TOTAL (%) |
|------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| | | ANÀLISIS POLAROGRAFÍQUES | VALORACIONS IODOMÈTRÍQUES | |
| Modificat amb Cu | 8 | 10 | | 80 |
| Modificat amb Zn | 10 | 37 | | 40 |
| Modificat amb Ce | 7 | | 20 | 35 |
| Modificat amb Fe | 13 | | 33 | 27 |

6.3.2.3 Isotermes d'absorció-desorció de N₂

Les isotermes d'absorció-desorció de nitrogen obtingudes per als xerogels que s'estan estudiant, han permès el càlcul dels valors de l'àrea superficial específica (S_p , m²·g⁻¹) i del volum específic dels porus (V_p , cm³·g⁻¹), mostrats a la Taula 6.5 (vegeu Figura 6.9). En base als resultats obtinguts, es pot afirmar que el xerogel sense modificar, així com els xerogels amb ferro, ceri i zinc, han mostrat isotermes característiques de sòlids sense porositat interna, alhora que les seves àrees superficials han resultat ésser relativament petites (S_p entre aproximadament 10 i 18 m²·g⁻¹), possiblement corresponents tan sols a la superfície externa de les partícules de xerogel. Només el xerogel amb coure ha presentat una àrea superficial considerable ($S_p = 103$ m²·g⁻¹) juntament amb una certa porositat interna. Si es relacionen aquests resultats amb el fet que el xerogel modificat amb coure posseeix la relació més elevada entre la concentració de metall superficial respecte a la total, i amb el fet que les micrografies han permès deduir que la superfície conté agregats de Cu(OH)_xO_y, es pot suposar que l'elevada àrea superficial i la porositat interna que mostra, són conseqüència directa de la presència d'aquestes partícules, a diferència de la bona dispersió del metall que presenten els altres xerogels deguda a la formació dels enllaços entre el metall i la matriu de sílice. D'altra banda, els valors obtinguts per al volum específic dels porus per a tots els xerogels avaluats han estat bastant baixos, excepte en el cas del xerogel modificat amb zinc. Una possible explicació podria trobar-se en la textura que mostra aquest material a la micrografia inclosa a la Figura 6.6, que deixa volums importants entre les partícules que es troben aglomerades.

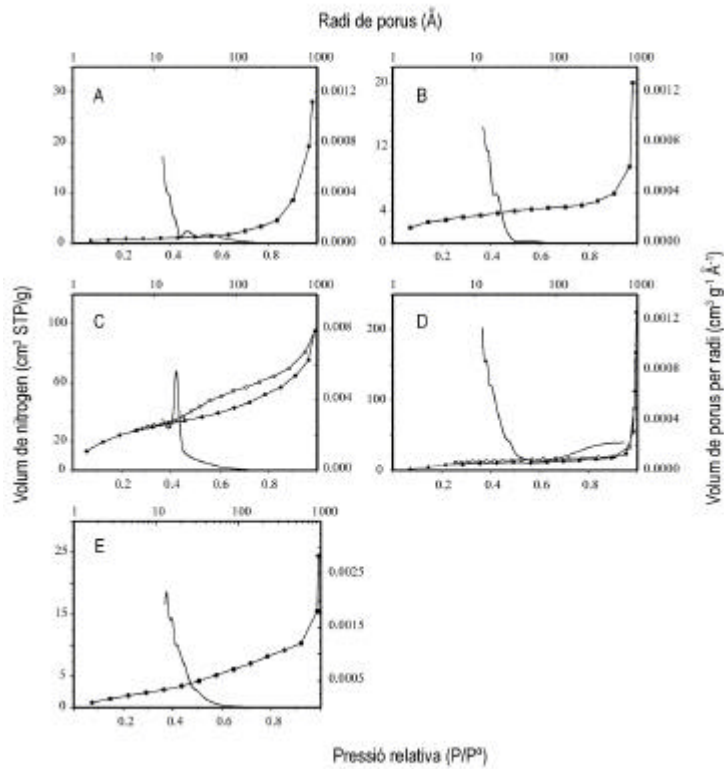


Figura 6.9: Isothermes d'absorció i desorció de nitrogen per als xerogels sense modificar (A) i modificats amb ceri (B), coure (C), zinc (D) i ferro (E).

Taula 6.5: Valors de l'àrea superficial específica i del volum específic dels porus, extrets de les isothermes d'absorció-desorció de N₂ per als diferents xerogels estudiats. Tots els càlculs s'han fet per a n= 3.

| TIPUS DE XEROGEL | S _p (m ² ·g ⁻¹) | V _p (cm ³ ·g ⁻¹) |
|------------------|---|--|
| Sense modificar | <10 | 0.01 |
| Modificat amb Cu | 103 | 0.12 |
| Modificat amb Zn | 18 | 0.35 |
| Modificat amb Ce | 10 | 0.01 |
| Modificat amb Fe | 11 | 0.02 |

6.3.2.4 Estudis termogravimètrics

Els resultats obtinguts amb els estudis termogravimètrics i les anàlisis tèrmiques diferencials (TG-DTA), en l'interval de temperatures de 150 a 550°C, proporcionen la pèrdua de pes corresponent a la quantitat de grups orgànics ancorats que s'han cremat durant l'escalfament. La Taula 6.6 inclou aquesta pèrdua en termes relatius, com a percentatge, així com els mols de grups $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{O})_3$ residuals per gram de sòlid. Aquestes dades mostren com la pèrdua de pes es situa entre un 21 i un 26 % per a tots els casos, valor que correspon a uns 1.6-2.0 mmol de grups $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{O})_3$ per gram de xerogel. A més, es confirma que la pèrdua de pes obtinguda és molt propera a la que teòricament caldria esperar si es considera que cada grup $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3$ es troba enllaçat a dues molècules de SiO_2 , amb petites desviacions que es poden atribuir al contingut d'aigua dels xerogels.

Taula 6.6: Dades de pèrdua de pes i de mols dels grups orgànics residuals $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{O})_3$ per gram de sòlid, obtinguts dels estudis termogravimètrics i de les anàlisis tèrmiques diferencials efectuades amb els diferents xerogels estudiats. Tots els càlculs s'han realitzat per a $n=3$.

| TIPUS DE XEROGEL | PÈRDUA DE PES (%) | GRUPS $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{O})_3$ PER GRAM DE XEROGEL (mmol·g ⁻¹) |
|------------------|-------------------|---|
| Sense modificar | 25.74 | 1.92 |
| Modificat amb Cu | 21.71 | 1.62 |
| Modificat amb Zn | 24.68 | 1.84 |
| Modificat amb Ce | 26.83 | 2.00 |
| Modificat amb Fe | 21.35 | 1.59 |

6.3.2.5 Estudi dels coeficients de difusió

Mitjançant estudis cronocoulombimètrics amb elèctrodes basats en xerogels modificats amb ceri i altres sense modificar, s'han obtingut gràfics de càrrega (Q) respecte del temps (t), dels quals s'han derivat automàticament els corresponents gràfics d'Anson. Aquests gràfics, que representen Q vers $t^{1/2}$, han resultat ésser lineals, com era d'esperar d'acord amb l'equació 6.1 per a processos limitats per difusió. A partir d'aquesta equació 6.1, es dedueix que el pendent de les rectes obtingudes per a la representació de Q respecte a $t^{1/2}$ correspon a l'equació 6.2, d'on és possible deduir el valor per al coeficient de difusió aparent (D_i) (vegeu equació 6.3), quan es coneix el número d'electrons (n) implicats a la reacció, el valor de la constant de Faraday (F), la concentració d'analit d'interès en la solució electrolítica (C), que en tots els casos ha estat 5 mols/m³, i l'àrea superficial (A) que és $0.02 \cdot 10^{-4}$ m²:

$$Q = \frac{2nFACD_f^{1/2}}{\pi^{1/2}} t^{1/2} \quad (6.1)$$

$$\text{pendent} = \frac{2nFAC}{\pi^{1/2}} D_f^{1/2} \quad (6.2)$$

$$D_f = \left(\frac{\text{pendent} \cdot \pi^{1/2}}{2nFAC} \right)^2 \quad (6.3)$$

Els valors calculats quan s'empra com a analit peròxid d'hidrogen o àcid ascòrbic es troben recollits a la Taula 6.7. Aquests resultats mostren com la incorporació de polietilenglicol a les membranes, representa un important increment dels coeficients de difusió aparents, que arriben a ser fins a 3 o 4 ordres de magnitud superiors als valors obtinguts per a membranes sense aquest component. Ara bé, quan el percentatge de polietilenglicol arriba al 30 % en relació al volum global de solució polimèrica, els coeficients de difusió aparents tornen a patir una davallada, és a dir, deixa d'estar tan afavorida la difusió. Una possible explicació a aquest comportament podria trobar-se en el fet que, a més de la pròpia difusió, cal tenir present el procés de catalisi que, de fet és per aquesta contribució addicional a la resposta que es parla de coeficients de difusió aparents. Aleshores, el comportament observat a mesura que augmenta la quantitat de polietilenglicol passa de valors petits per al coeficient de difusió quan no hi ha polietilenglicol, degut a la barrera difusional que suposa la pròpia membrana a causa de la poca porositat que presenta, cap a valors més elevats, atès que l'addició de polietilenglicol provoca un augment de la porositat de la membrana, que afavoreix la difusió de les espècies al seu través. Ara bé, arriba un punt en què la quantitat de polietilenglicol és tan elevada que, a més de provocar un increment molt important de la porositat, pot arribar a emascarar els centres metàl·lics, que cada vegada veuen més reduïda la seva presència a favor de la de més polietilenglicol. Aquest pot ésser un dels motius pels quals hi ha una disminució dels coeficients de difusió per a un percentatge del 30 % de polietilenglicol, molt important en el cas del xerogel amb ceri, quan s'empra peròxid d'hidrogen com a analit. Però tot i que aquesta davallada no és tan important per al xerogel sense metall, continua observant-se aquesta tendència, fet que no hauria de ser així, atès que ara no hi ha centres metàl·lics responsables de la resposta catalítica. És per tot això que se suposa que a part de l'argument exposat prèviament, hi ha d'haver algun altre factor relacionat que trenqui la tendència a augmentar la porositat a mesura que augmenta la presència de polietilenglicol.

Taula 6.7: Coeficients de difusió aparents (D_r) calculats a partir d'estudis cronocoulombimètrics quan es treballa amb una cel·la electroquímica que conté tampó fosfat 0.25 M amb KCl 0.5 M a pH 6.5, amb una concentració 5 mM de l'analit estudiat. Cada valor és la mitjana de 3 mesures experimentals.

| TIPUS DE XEROGEL | ANALIT | COEFICIENTS DE DIFUSIÓ ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) | | |
|------------------|------------------------|--|--|--|
| | | MEMBRANA AMB ACETAT DE CEL-LULOSA | MEMBRANA AMB ACETAT DE CEL-LULOSA I 20 % DE POLIETILENGLICOL | MEMBRANA AMB ACETAT DE CEL-LULOSA I 30 % DE POLIETILENGLICOL |
| Sense modificar | H_2O_2 | $2.63 \cdot 10^9$ | $1.07 \cdot 10^6$ | $7.47 \cdot 10^7$ |
| Modificat amb Ce | H_2O_2 | $1.26 \cdot 10^9$ | $6.88 \cdot 10^6$ | $1.50 \cdot 10^6$ |
| Modificat amb Ce | Àcid ascòrbic | $7.98 \cdot 10^{10}$ | $2.71 \cdot 10^6$ | $1.08 \cdot 10^6$ |

6.3.2.6 Espectroscòpia d'impedàncies

La Taula 6.8 inclou els valors de resistència i de capacitat que mostren les diferents membranes basades en xerogels que s'han dipositat sobre la superfície d'electrodes de platí (vegeu Figura 6.10). Aquests valors permeten afirmar que la modificació dels xerogels amb metalls contribueix a reduir de manera important la resistència aparent que presenten. A més, quan la preparació de les membranes incorpora polietilenglicol encara és més pronunciada la disminució de la resistència aparent, alhora que la capacitat incrementa notablement, i atès que la capacitat es pot emprar com a una mesura semiquantitativa de la part de la membrana accessible per a la solució aquosa, això indica una important millora de l'accés de l'analit dissolt a la solució aquosa que envolta la membrana, quan es treballa amb aquest tipus de membranes.

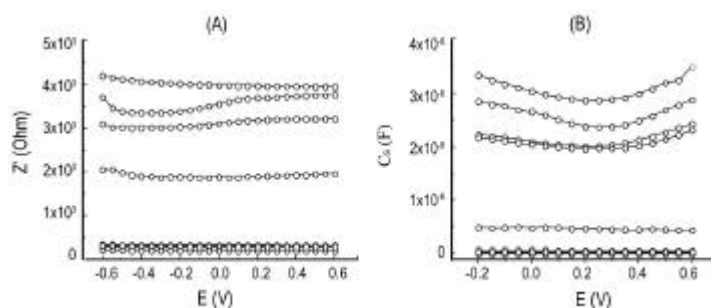


Figura 6.10: (A) Representació de les impedàncies vers el potencial aplicat per a una sèrie de membranes, quan s'empra una freqüència de 20 kHz i una amplitud de 10 mV. (B) Mesures de capacitat per a les mateixes membranes quan s'aplica una freqüència de 10 Hz i una amplitud de 10 mV. Les membranes avaluades de dalt a baix a (A) i de baix a dalt a (B), segueixen el següent ordre: xerogels sense modificar i modificats amb ferro, zinc i ceri respectivament, amb acetat de cel·lulosa, i xerogels sense modificar i modificats amb ceri, zinc i ferro respectivament, amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol.

Taula 6.8: Valors de resistència i capacitat per a diferents membranes basades en xerogels, obtinguts a partir d'estudis d'impedàncies. Les membranes s'han preparat amb acetat de cel·lulosa (AC) i polietilenglicol (PEG). Les dades de capacitat per unitat d'àrea s'han calculat a partir del valor de la superfície electròdica total efectiva de l'elèctrode de platí, que s'ha determinat mitjançant estudis cronocoulombimètrics quan la cel·la electroquímica contenia hexacianoferrat ($D_r = 7.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, a pH 3.0). Tots els càlculs s'han realitzat per a $n = 3$.

| TIPUS DE MEMBRANA | RESISTÈNCIA (Z', Ohm) | CAPACITAT (Cs, $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$) |
|-------------------------------------|--------------------------|--|
| Xerogel sense modificar / AC | $4.01 \cdot 10^3$ | 0.04 |
| Xerogel modificat amb Zn / AC | $3.11 \cdot 10^3$ | 3.3 |
| Xerogel modificat amb Fe / AC | $3.56 \cdot 10^3$ | 1.7 |
| Xerogel modificat amb Ce / AC | $1.92 \cdot 10^3$ | 23 |
| Xerogel sense modificar / AC / PEG | $0.33 \cdot 10^3$ | 110 |
| Xerogel modificat amb Zn / AC / PEG | $0.29 \cdot 10^3$ | 142 |
| Xerogel modificat amb Fe / AC / PEG | $0.22 \cdot 10^3$ | 171 |
| Xerogel modificat amb Ce / AC / PEG | $0.31 \cdot 10^3$ | 115 |

6.3.2.7 Estudi de les interferències per a un elèctrode preparat amb membranes basades en composts de xerogels amb metalls

La Figura 6.11 representa amb un gràfic de barres, la diferència entre la intensitat de corrent catalític corregida dels pics d'oxidació i reducció, extreta dels voltamperogrames cíclics corresponents als elèctrodes preparats amb l'hidrogel de ceri diluït i amb el xerogel de ceri amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, quan la cel·la electroquímica conté àcid ascòrbic 2.5 mM. També apareix la comparació amb la resposta a peròxid d'hidrogen 2.5 mM del mateix elèctrode amb xerogel. La magnitud dels pics demostra la capacitat de les membranes preparades amb xerogel mesclat amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol per permetre la detecció de l'analit d'interès (peròxid d'hidrogen) i rebutjar el pas fins a la superfície electròdica d'una espècie interferent com l'àcid ascòrbic. En canvi, aquest pas no es troba impedit quan es treballa amb membranes basades en l'hidrogel diluït.

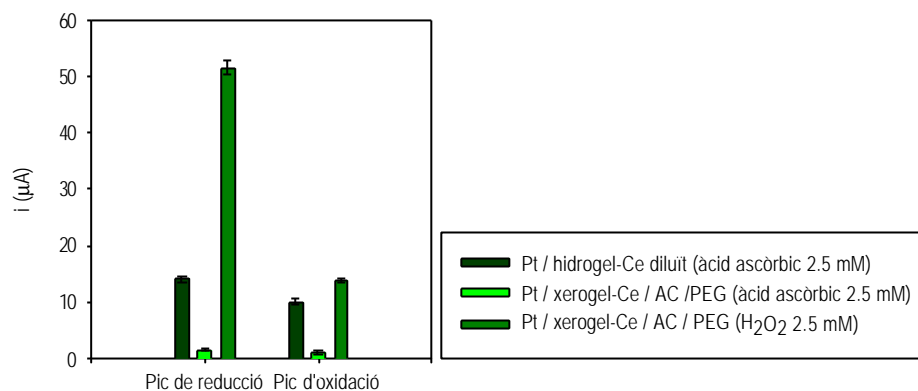


Figura 6.11: Estudi comparatiu de la intensitat de corrent obtinguda per solucions d'àcid ascòrbic i de peròxid d'hidrogen, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de platí recobert amb una dilució d'un hidrogel de ceri o amb una membrana basada en la mescla d'un xerogel de ceri amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol. Els valors representats són la mitjana de 3 valors extrets dels pics d'oxidació i reducció dels corresponents voltamperogrames cíclics. Per a cada barra s'indica \pm la desviació estàndard associada a la mitjana.

6.3.2.8 Optimització del pH de la solució amortidora emprada

Tal com ja es va fer pels elèctrodes modificats amb hidrogels, s'ha dut a terme l'optimització del pH del tampó fosfat 0.05 M i KCl 0.05 M, emprat com a solució de treball, però ara per a elèctrodes modificats amb membranes basades en xerogels amb metalls mesclats amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol.

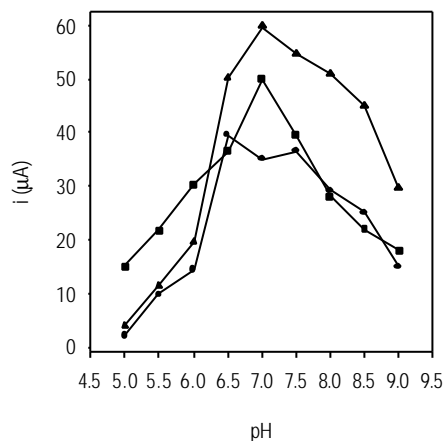


Figura 6.12: Estudi de la intensitat de corrent mesurada per a una solució de peròxid d'hidrogen 5 mM en funció del pH de la solució amortidora quan es treballa amb elèctrodes de platí recoberts amb membranes basades en xerogels modificats amb ferro (?), ceri (■) o zinc (?), mesclats amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol. El potencial aplicat ha estat 0.65 V.

La Figura 6.12 recull el perfil de les mesures amperomètriques, per a solucions de peròxid d'hidrogen 5 mM, en vers el pH. Aquestes mesures d'intensitat de corrent s'han obtingut per a tots els elèctrodes preparats, excepte per al de coure, atès que ha mostrat un comportament inestable que ha fet inviable el seu ús continuat per a la realització de l'estudi.

S'observa com el pH òptim de la solució tampó per als elèctrodes modificats amb xerogels modificats amb ferro resulta ésser 6.5, mentre que els elèctrodes preparats amb xerogels modificats amb zinc i ceri, han mostrat un comportament òptim quan el pH de la solució amortidora és 7.0. La Figura 6.13 mostra els voltamperogrames cíclics obtinguts, per a tots aquests elèctrodes, quan es treballa amb una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM al pH òptim per a cadascun d'ells. En el cas de l'elèctrode modificat amb una membrana que conté xerogel amb coure s'ha triat un pH igual a 7.0, atès que s'ha observat un comportament correcte quan s'empra solució tampó d'aquest pH. De nou, com ja es va veure a § 6.3.1.5, la comparació de les intensitats de corrent dels pics d'oxidació i reducció per a elèctrodes preparats amb membranes basades en xerogels modificats amb metalls, respecte de les obtingudes per a elèctrodes amb membranes que s'han preparat de la mateixa manera però amb els corresponents xerogels sense metalls, confirma l'efecte catalític provocat pels centres metàl·lics presents a la membrana.

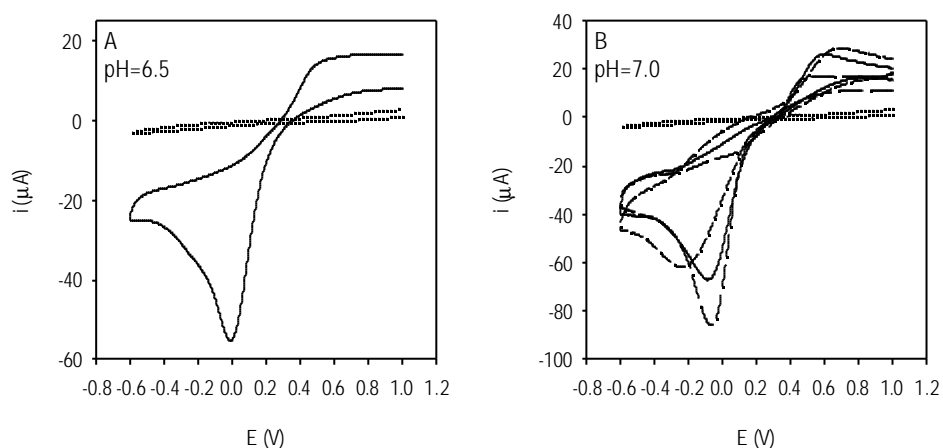


Figura 6.13: Voltamperogrames cíclics corresponents a una solució de peròxid d'hidrogen 2.5 mM, quan es treballa amb elèctrodes recoberts amb membranes basades en mesclades d'acetat de cel·lulosa i polietilenglicol amb xerogels. En tots els casos, els voltamperogrames representats amb línies de punts corresponen a elèctrodes amb xerogels sense metalls, mentre que a (A) la línia contínua és per a un elèctrode amb xerogel modificat amb ferro, i a (B) les línies discontinua de traç curt, discontinua de traç llarg i contínua van associades a elèctrodes preparats amb xerogels modificats amb coure, zinc i ceri, respectivament. Velocitat d'escombrat: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

6.3.2.9 Estudi de la resposta amperomètrica a H₂O₂

La Taula 6.9 inclou els paràmetres de calibració obtinguts de les corbes de calibració per a peròxid d'hidrogen quan s'empren elèctrodes modificats amb membranes basades en la mescla d'acetat de cel·lulosa i polietilenglicol, amb xerogels modificats amb metalls.

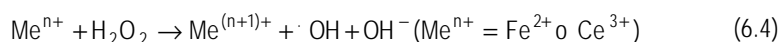
Taula 6.9: Paràmetres de calibració corresponents a les corbes de calibració per a l'oxidació i la reducció de peròxid d'hidrogen, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode de plati recobert amb diferents tipus de membranes preparades amb acetat de cel·lulosa (AC), polietilenglicol (PEG) i xerogels, modificats amb metalls o sense modificar. Cada valor s'ha calculat per a n= 3, excepte la repetitivitat (RSD) de la intensitat de corrent que s'ha calculat a partir de 5 mesures consecutives per a una concentració de peròxid d'hidrogen 0.1 mM.

| TIPUS DE MEMBRANA | INTERVAL LINEAL (M) | MITJANA DEL PENDENT DE CALIBRACIÓ (mA/M) | LÍMIT DE DETECCIÓ (μM) | COEFICIENT DE CORRELACIÓ | REPETITIVITAT (RSD, %) |
|---|---|--|------------------------|--------------------------|------------------------|
| A. Oxidació de peròxid d'hidrogen a 0.65 V | | | | | |
| AC | 4·10 ⁻⁶ – 3.5·10 ⁻⁴ | 7.12 | 4 | 0.9846 | |
| AC / PEG | 4·10 ⁻⁶ – 3.5·10 ⁻⁴ | 6.66 | 4 | 0.9997 | |
| Xerogel sense metall / AC / PEG | 8·10 ⁻⁶ – 3.5·10 ⁻⁴ | 6.99 | 6 | 0.9998 | |
| Xerogel modificat amb ceri / AC / PEG | 8·10 ⁻⁷ – 8·10 ⁻⁴ | 37.53 | 0.4 | 0.9999 | 2.2 |
| Xerogel modificat amb zinc / AC / PEG | 8·10 ⁻⁷ – 8·10 ⁻⁴ | 18.86 | 0.8 | 0.9992 | 2.8 |
| Xerogel modificat amb ferro / AC / PEG | 4·10 ⁻⁶ – 3.5·10 ⁻⁴ | 7.35 | 4 | 0.9999 | |
| Xerogel modificat amb coure / AC / PEG | 8·10 ⁻⁶ – 3.5·10 ⁻⁴ | 4.27 | 8 | 0.9985 | |
| B. Reducció de peròxid d'hidrogen a -0.2 V | | | | | |
| AC | 4·10 ⁻⁵ – 3.5·10 ⁻⁴ | -1.22 | 25 | 0.9985 | |
| AC / PEG | 2·10 ⁻⁵ – 3.5·10 ⁻⁴ | -1.43 | 15 | 0.9998 | |
| Xerogel sense metall / AC / PEG | 4·10 ⁻⁵ – 3.5·10 ⁻⁴ | -1.79 | 30 | 0.9996 | |
| Xerogel modificat amb ceri / AC / PEG | 4·10 ⁻⁶ – 6·10 ⁻⁴ | -4.54 | 2 | 0.9956 | 2.6 |
| Xerogel modificat amb zinc / AC / PEG | 4·10 ⁻⁶ – 6·10 ⁻⁴ | -7.82 | 1 | 0.9968 | 2.6 |
| Xerogel modificat amb ferro / AC / PEG | 2·10 ⁻⁶ – 6·10 ⁻⁴ | -5.01 | 2 | 0.9997 | 3.1 |
| Xerogel modificat amb coure / AC / PEG | 4·10 ⁻⁵ – 3.5·10 ⁻⁴ | -1.57 | 25 | 0.9989 | |

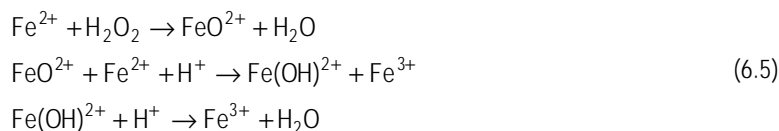
D'aquestes dades es dedueix la capacitat d'aquest tipus d'elèctrodes per a poder determinar peròxid d'hidrogen, tant mitjançant la seva oxidació com la seva reducció. Quan s'empren els valors de sensibilitat i d'interval lineal assolits, com a criteri de selecció de l'elèctrode amb unes millors característiques com a quimiosensor per a la determinació de peròxid d'hidrogen, s'observa com els elèctrodes basats en xerogels amb ceri i zinc són els més efectius per a la determinació de peròxid d'hidrogen en base a la seva oxidació a 0.65 V. En canvi, els elèctrodes basats en xerogels modificats amb ferro no aconsegueixen cap millora en relació als resultats obtinguts per a un elèctrode amb xerogel no modificat o per a elèctrodes preparats només amb acetat de cel·lulosa o amb acetat de cel·lulosa i polietilenglicol. D'altra banda, quan es treballa a -0.2 V, és a dir, a un potencial que permet la reducció del peròxid d'hidrogen, els elèctrodes que mostren un comportament òptim han estat els preparats amb xerogels modificats amb zinc. És important destacar l'absència d'efecte catalític, tant per a l'oxidació com per a la reducció de peròxid d'hidrogen, quan s'empra com a elèctrode de treball un elèctrode basat en un xerogel modificat amb coure. Una possible explicació a aquest comportament pot ésser el fet que les membranes basades en aquests xerogels amb coure han resultat ésser força inestables, com ho demostra el canvi de color que experimenten de blau a verd fosc en unes poques hores.

6.3.2.10 Justificació del caràcter catalític mostrat per cadascun dels xerogels avaluats

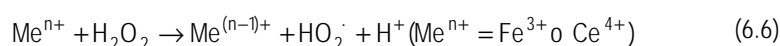
En primer lloc, és necessari buscar una explicació a la capacitat que mostren alguns dels xerogels preparats per catalitzar, tant l'oxidació com la reducció del peròxid d'hidrogen, comportament que ja ha estat descrit a la bibliografia^{53,54,55} per a diferents superfícies electròdiques modificades amb metalls. Aquest tipus de comportament es pot explicar en base a diferents hipòtesis. Així, per exemple, la reducció de peròxid d'hidrogen que té lloc quan es treballa amb elèctrodes modificats amb xerogels amb ceri o ferro, pot venir donada per l'equació 6.4, que acaba formant radicals hidroxils lliures.



Ara bé, una altra possible reacció que explicaria la reducció de peròxid d'hidrogen amb elèctrodes preparats amb aquest mateix xerogel modificat amb ferro, és la *reacció de Fenton* (equació 6.5).



D'altra banda, l'equació 6.6 correspon al mecanisme que possiblement segueix l'oxidació de peròxid d'hidrogen quan es treballa amb elèctrodes recoberts amb membranes que contenen els xerogels modificats que s'han preparat. Aquesta reacció d'oxidació del peròxid d'hidrogen té lloc mitjançant la formació de radicals perhidroxils lliures.



Per tant, tots els mecanismes exposats justifiquen el comportament ambivalent que presenten els elèctrodes preparats amb els xerogels modificats amb metalls que s'estan avaluant.

Si es considera que aquests mecanismes són vàlids per als ions metàl·lics situats a la interfase platí-membrana, atès que aquests poden canviar fàcilment el seu estat d'oxidació segons quin sigui el valor de potencial que s'està aplicant, mentre que els que es troben a l'interior de la matriu de sílice o a la interfase metall-solució no seran potencialment actius, ja que no són susceptibles de canviar la seva càrrega segons el potencial aplicat, cal plantejar quina és la naturalesa de les propietats catalítiques que també presenten els elèctrodes preparats amb xerogels amb zinc, un ió metàl·lic que no posseeix propietats electroquímiques. Un possible plantejament que expliqui el bon comportament observat, tant per a l'oxidació com per a la reducció de peròxid d'hidrogen, quan es treballa amb elèctrodes amb xerogel modificat amb zinc, pot relacionar-se amb la capacitat de diversos òxids metàl·lics que actuen com a catalitzadors en la descomposició d'aquest compost.⁵⁶ Aquesta és una catàlisi heterogènia, de caràcter no electroquímic, que a més de donar H_2O i O_2 com a productes, també genera algunes espècies intermèdies de naturalesa electroactiva, com ara els radicals $\text{OH}\cdot$ o $\text{HOO}\cdot$, que poden difondre a través de la matriu de sílice fins a la superfície electròdica de platí, on poden reaccionar electroquímicament.⁵⁷ Tanmateix, aquest argument es troba recolzat amb els valors de volum específic de porus obtinguts amb el xerogel de zinc, que resulten ésser els més elevats, i a la relació de concentracions superficial/total de zinc al xerogel, que ha estat la més baixa.

Per últim, només queda buscar un motiu que justifiqui els mals resultats obtinguts per als elèctrodes preparats amb xerogels modificats amb coure. Com ja s'ha comentat prèviament, la principal causa per a aquest comportament ha estat la pròpia inestabilitat mostrada per les membranes preparades amb aquest xerogel. Però a aquest argument cal afegir la presència d'agregats amb coure a la superfície exterior de les membranes, que no han format enllaços covalents amb la matriu de sílice, a diferència de la resta de xerogels, de manera que molt probablement s'han perdut per dissolució durant la preparació de les membranes.

6.4 CONCLUSIONS

D'aquest capítol es poden extreure les següents conclusions:

1 S'ha comprovat el caràcter catalític de les membranes preparades amb 3-aminopropiltrimetoxisilans modificats amb metalls, com a hidrogels i com a xerogels, aplicats sobre la superfície d'elèctrodes de platí, quan es determina peròxid d'hidrogen tant per oxidació com per reducció. Aquests nous gels de sílice han demostrat ésser eficients com a materials catalítics, atès que s'ha observat un increment considerable de la sensibilitat obtinguda quan contenen metalls respecte a la que mostren quan no estan modificats.

2 El fet d'ésser materials híbrids, en relació al fet que són preparats amb precursors orgànics i inorgànics, és el que ha permès la formació d'enllaços covalents entre el metall i els grups amino aportats pel precursor APTMS en una matriu inorgànica originada pel silà TEOS. Aquests enllaços eviten la formació de conglomerats metàl·lics, excepte en el cas dels gels modificats amb coure. En aquest cas, el catalitzador bàsic actua sobre els enllaços Si-Cu per a formar complexos solubles ($[\text{Cu}(\text{NH}_3)]^{2+}$) que poden ésser adsorbits o atrapats feblement a la matriu de sílice, de manera que s'acaben perdent a la solució durant el procés de condensació.

3 L'estudi comparatiu dels hidrogels, diluïts o mesclats amb acetat de cel·lulosa, ha portat a concloure que aquests darrers mostren unes millors característiques mecàniques i electroquímiques, alhora que asseguren, gràcies a la presència de l'acetat de cel·lulosa, unes propietats òptimes com a barrera difusional en front de possibles espècies interferents carregades, com els àcids ascòrbic i úric, o neutres, com la dopamina.

4 L'estudi de les membranes basades en xerogels mesclats amb acetat de cel·lulosa i/o polietilenglicol, ha demostrat que quan es treballa amb composts basats en xerogel dispersos en acetat de cel·lulosa i polietilenglicol s'obté una homogeneïtat de la solució final, una adherència sobre la superfície electròdica i un comportament electroquímic òptims.

5 Les membranes basades exclusivament en xerogel i acetat de cel·lulosa, tot i ésser homogènies i mostrar una bona adherència al platí, presenten una baixa conductivitat, fet que ve confirmat amb els valors de resistència obtinguts mitjançant estudis d'impedàncies, així com coeficients de difusió que indiquen limitacions del pas de l'analit al seu través i capacitats baixes que representen una mesura semiquantitativa de la seva facilitat a ésser hidratades i, per tant, a que tinguin accés l'analit i el solvent al seu interior.

6 Les membranes preparades amb xerogel i polietilenglicol no han mostrat una adherència adequada a la superfície electròdica, i en canvi l'addició d'acetat de cel·lulosa a aquestes, ha ofert millors propietats mecàniques, un increment de la resistència química, un augment de l'estabilitat tèrmica, una clara millora de la dispersió de les partícules de xerogel a la membrana i ha confirmat, de nou, que la presència de l'acetat de cel·lulosa com a emulsionant, dificulta l'accés d'espècies interferents cap a la superfície electròdica, atès que aquest compost actua com a barrera difusional, fet que alhora assegura l'obtenció d'interval·ls lineals amplis. El percentatge de polietilenglicol esdevé molt important per a

l'obtenció de paràmetres de calibració òptims, atès que percentatges baixos donen membranes no gaire conductores i la seva capacitat catalítica no es troba del tot afavorida. D'altra banda, quan el percentatge és massa elevat, la capacitat catalítica es veu deteriorada, possiblement com a conseqüència de la disminució de la quantitat de centres metàl·lics catalítics que esdevé com a resultat de l'increment de la proporció de polietilenglicol a la membrana.

7 La resistència que ofereixen els xerogels amb metalls és menor que la corresponent a xerogels sense modificar. A més, aquest paràmetre encara es troba més afavorit quan les membranes contenen polietilenglicol juntament amb l'acetat de cel·lulosa. D'altra banda, aquest augment de la conductivitat va acompanyat d'un increment de la capacitat, que indica una millor accessibilitat de l'analit i del dissolvent cap a l'interior de la membrana.

8 L'estudi morfològic dels xerogels mostra una estructura diferent per cadascun d'ells segons quin sigui el metall incorporat, alhora que demostra la contribució del polietilenglicol per a l'obtenció d'una dispersió regular i homogènia de les partícules de xerogel al compost que forma les membranes. A més, aquesta bona dispersió, possiblement deguda a la formació d'enllaços entre els metalls i la matriu de sílice, és de vital importància per a garantir el major número possible de col·lisions entre molècules d'analit i centres catalítics.

9 L'ús de l'espectrometria d'energia dispersiva confirma l'excel·lent dispersió dels metalls sobre la superfície de les partícules, excepte per al xerogel amb coure, que forma partícules de $\text{Cu}(\text{OH})_x\text{O}_y$ i conglomerats de coure que, com ja s'ha comentat, són resultat de l'efecte del catalitzador bàsic sobre els enllaços entre coure i silici. L'existència de les partícules de $\text{Cu}(\text{OH})_x\text{O}_y$, corroborada per les micrografies de microscòpia electrònica d'escombrat i per l'elevada relació entre la concentració del metall a la superfície respecte al metall total, es creu que influeix en l'obtenció d'una àrea superficial més elevada per a aquest xerogel i d'un cert grau de porositat absent en la resta de xerogels modificats amb metalls que s'han estudiat. Pel que fa al volum específic dels porus, per a tots els xerogels avaluats ha estat petit, excepte per al de zinc, que presenta una textura diferent amb grans volums entre partícules uniformes que s'han agregat.

10 S'ha determinat per a tots els xerogels una pèrdua de pes d'entre 21 i 26 % corresponent als grups orgànics ancorats que s'han cremat com a conseqüència de l'escalfament aplicat a les mostres, percentatge que està d'acord amb el teòric que s'obté si es considera que cada grup $\text{H}_3\text{N}-(\text{CH}_2)_3$ es troba enllaçat a 2 molècules de diòxid de silici.

11 La determinació amperomètrica de peròxid d'hidrogen basada en la seva oxidació ha estat òptima per als elèctrodes preparats amb membranes basades en xerogels modificats amb ceri o zinc, mentre que quan s'ha treballat amb l'aplicació d'un potencial de reducció, els millors resultats s'han obtingut de nou amb l'elèctrode modificat amb el xerogel amb zinc. Els xerogels amb ferro no han permès confirmar cap efecte catalític ni per a l'oxidació ni per a la reducció de peròxid d'hidrogen. Finalment, els xerogels de coure no han estat prou estables com per fer viable el seu ús prolongat com a materials catalítics per al desenvolupament de quimiosensors adreçats a la determinació electroquímica de peròxid d'hidrogen.

12 Els ions metàl·lics electroactius, com el ceri i el ferro, situats a la interfase platí-membrana, poden canviar fàcilment el seu estat d'oxidació quan s'aplica un potencial determinat, i això explica la seva participació com a centres catalítics tant per a processos d'oxidació com de reducció. En canvi, en el cas del zinc, que és un metall no electroactiu, se suggereix una catàlisi heterogènia que passa per la formació de diversos radicals lliures que sí posseeixen propietats electroquímiques. Es postula que aquests radicals difonen a través de la matriu de sílice, procés que en el cas dels xerogels amb zinc es veu afavorit per la presència d'un elevat volum específic de porus, fins a la superfície electròdica, on seran oxidats o reduïts.

6.5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ L. Gorton, E. Csöregi, E. Domínguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga, B. Persson. *Analytica Chimica Acta*, **250** (1991) 203-248
- ² L. Gorton. *Electroanalysis*, **7** (1995) 23-45
- ³ E. Csöregi, L. Gorton, G. Marko-Varga. *Analytica Chimica Acta*, **273** (1993) 59-70
- ⁴ J. Zhao, R. W. Henkens, J. Stonehuerner, J. P. O'Daly, A. L. Crumbliss. *Electroanalytical Chemistry*, **327** (1992) 109-119
- ⁵ T. Tatsuma, M. Gondaira, T. Watanabe. *Analytical Chemistry*, **64** (1992) 1183-1187
- ⁶ S. J. Updike, G. P. Hicks. *Nature*, **214** (1967) 986-988
- ⁷ G. G. Guilbault, G. J. Lubrano. *Analytica Chimica Acta*, **60** (1972) 254-256
- ⁸ J. E. Frew, H. A. O. Hill. *Analytical Chemistry*, **59** (1987) 933A-944A
- ⁹ G. Jönsson, L. Gorton. *Biosensors*, **1** (1985) 355-368
- ¹⁰ G. Jönsson, L. Gorton, L. Pettersson. *Electroanalysis*, **1** (1989) 49-55
- ¹¹ J. J. Kulys, N. K. Cenas. *Biochimica et Biophysica Acta*, **744** (1983) 57-63
- ¹² U. Wollenberger, V. Bogdanovskaya, S. Bobrin, F. Scheller, M. Tarasevich. *Analytical Letters*, **23** (1990) 1795-1808
- ¹³ L. Gorton, G. Bremle, E. Csöregi, B. Persson, G. Jönsson-Pettersson. *Analytica Chimica Acta*, **249** (1991) 43-54
- ¹⁴ P. D. Sánchez, P. T. Blanco, J. M. F. Álvarez, M. R. Smyth, R. O'Kennedy. *Electroanalysis*, **2** (1990) 303-308
- ¹⁵ L. Gorton. *Analytica Chimica Acta*, **178** (1985) 247-253
- ¹⁶ G. H. Heider, S. V. Sasso, K. Huang, A. M. Yacynych, H. J. Wieck. *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 1106-1110
- ¹⁷ P. Pantano, W. G. Kuhr. *Electroanalysis*, **7** (1995) 405-416
- ¹⁸ D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi. *Chemistry of Materials*, **6** (1994) 1605-1614
- ¹⁹ S. A. Yamanaka, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink. *Journal of the American Chemical Society*, **117** (1995) 9095-9096
- ²⁰ J. Wang, P. V. A. Pamidi. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 1171-1175
- ²¹ N. Momeni, K. Ramanathan, P.-O. Larsson, B. Danielsson, S. Bengmark, M. Khayyami. *Analytica Chimica Acta*, **387** (1999) 21-27
- ²² Z. Chen, L. A. Samuelson, J. Akkara, D. L. Kaplan, H. Gao, J. Kumar, K. A. Marx, S. K. Tripathy. *Chemistry of Materials*, **7** (1995) 1779-1783
- ²³ S. B. Khoo, F. Chen. *Analytical Chemistry*, **74** (2002) 5734-5741
- ²⁴ J. Gun, O. Lev. *Analytica Chimica Acta*, **336** (1996) 95-106
- ²⁵ M. M. Verghese, K. Ramanathan, S. M. Ashraf, M. N. Kamalasanan, B. D. Malhotra, *Chemistry of Materials*, **8** (1996) 822-824

- ²⁶ S. Bharathi, O. Lev. *Chemical Communications*, (1997) 2303-2304
- ²⁷ X. Chen, J. Z. Zhang, B. Q. Wang, G. J. Cheng, S. J. Dong. *Analytica Chimica Acta*, **434** (2001) 255-260
- ²⁸ S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi. *Materials Letters*, **10** (1990) 1-5
- ²⁹ A. K. Williams, J. T. Hupp. *Journal of the American Chemical Society*, **120** (1998) 4366-4371
- ³⁰ S. Yang, Y. Lu, P. atanossov, E. Wilkins, X. Long. *Talanta*, **47** (1998) 735-743
- ³¹ B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 1120A-1127A
- ³² U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramanathan, N. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan, S. Chandra. *Analytical Chemistry*, **66** (1994) 3139-3144
- ³³ I. Pankrotov, O. Lev. *Electroanalytical Chemistry*, **393** (1995) 35-41
- ³⁴ S. Sampath, O. Lev. *Electroanalysis*, **8** (1996) 1112-1116
- ³⁵ S. A. Yamanaka, F. Nishida, L. M. Ellerby, C. R. Nishida, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink. *Chemistry of Materials*, **4** (1992) 495-497
- ³⁶ K. Ramanathan, B. R. Jönsson, B. Danielsson. *Analytica Chimica Acta*, **427** (2001) 1-10
- ³⁷ I. Gill, A. Ballesteros. *Trends in Biotechnology*, **18** (2000) 282-296
- ³⁸ A. M. Buckley, M. Greenblatt. *Journal of Chemical Education*, **71** (1994) 599-602
- ³⁹ B. Wang, J. Zhang, S. Dong. *Biosensors & Bioelectronics*, **15** (2000) 397-402
- ⁴⁰ R. B. Bhatia, C. J. Brinker. *Chemistry of Materials*, **12** (2002) 2434-2441
- ⁴¹ D. A. Nivens, Y. Zhang, S. Michael Angel. *Analytica Chimica Acta*, **376** (1998) 235-245
- ⁴² D. A. Nivens, M. V. Schiza, S. Michael Angel. *Talanta*, **58** (2002) 543-550
- ⁴³ I. Gill. *Chemistry of Materials*, **13** (2001) 3404-3421
- ⁴⁴ A. Kumar, R. Malhotra, B. D. Malhotra, S. K. Grover. *Analytica Chimica Acta*, **414** (2000) 43-50
- ⁴⁵ A T. Bein (Ed.). *ACS Symposium Series: Supramolecular Architecture. Synthetic Control in Thin Films and Solids*, **499**, Washington DC, American Chemical Society (1992) pp 384-404
- ⁴⁶ S. Shtelzer, S. Rappoport, D. Avnir, M. Ottolenghi, S. Braun. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **15** (1992) 227-235
- ⁴⁷ W. R. Heineman. *Current Separations*, **68** (1986) 2015-2021
- ⁴⁸ M. I. Prodromidis, P. G. Veltsistas, M. I. Karayannis. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 3995-4002
- ⁴⁹ S. Sampath, O. Lev. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2015-2021
- ⁵⁰ A A. E. G. Cass (Ed.). *Biosensors: A Practical Approach*. Oxford, Oxford University Press (1990) Capitol 1
- ⁵¹ T. Matsumoto, M. Furusawa, H. Fujiwara, Y. Matsumoto, N. Ito. *Sensors and Actuators*, **B49** (1998) 68-72
- ⁵² R. Vaidya, E. Wilkins. *Electroanalysis*, **6** (1994) 677-682

- ⁵³ M. Somasundrum, K. Kirtikara, M. Tanticharoen. *Analytica Chimica Acta*, **259** (1992) 211-218
- ⁵⁴ J. Pei, X.-Y. Li. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **441** (1998) 245-258
- ⁵⁵ D. R. Shankaran, N. Uehara, T. Kato. *Biosensors & Bioelectronics*, **18** (2003) 721-728
- ⁵⁶ A C. W. Jones (Ed.). *Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives*. Cambridge, RSC (1999)
- ⁵⁷ J. Weiss. *A: Advances in Catalysis and Related Subjects*. New York, Academic Press, Vol. IV (1952)