

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN QUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO [2022-2023]

TÍTULO:

**SÍNTESIS DE GELES DE SÍLICE MODIFICADOS
CON GRUPOS ORGÁNICOS PARA MEJORAR LA
RESPUESTA DE BIOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS PARA EL MEDIO MARINO.**

AUTOR:

SERGIO SORIANO TOMÁS

Resumen:

En el presente estudio se ha realizado la síntesis de monolitos de sílice para su uso en biosensores electroquímicos. Se plantea la funcionalización del gel de sílice con modificadores de red orgánicos, que en este caso se tratan de grupos metilos y fenilos. El objetivo es conseguir que difunda de manera más rápida el analito hacia el bioreceptor, produciéndose así una mejor respuesta del biosensor.

El biosensor se basa en la respuesta como bioreceptor de una enzima que es capaz de catalizar reacciones de hidrólisis de grupos fosfatos, la fosfatasa alcalina (ALP); por ello, el sustrato elegido es la difosfato hidroquinona (HQDP), ya que, tras la hidrólisis mencionada, se forma hidroquinona, siendo esta una especie electroquímicamente activa, pudiéndose medir con la ayuda de técnicas amperométricas. Como parte del proceso, se han utilizado tanto electrodos de monocristal de platino poliorientado como serigrafados de carbono. Además, se realizó una caracterización previa de hidroquinona (HQ) en disolución, tanto en medio ácido como en medio básico.

Para llevar a cabo el presente trabajo se realizó una síntesis Sol-Gel con el objetivo de preparar monolitos de gel de sílice y probar los diferentes modificadores de red al añadirles HQ, y medir su respuesta mediante voltamperometría cíclica. Seguidamente, los modificadores que mejor respuesta dieron se probaron en medio marino, donde se encapsuló la ALP en el interior de la matriz de sílice. Por último, se añadió HQDP con tal comprobar su respuesta con la ayuda de la voltamperometría cíclica.

Los objetivos del presente estudio se centran en caracterizar la actividad electroquímica de la hidroquinona para calcular su coeficiente de difusión y su constante de transferencia heterogénea en una disolución básica. Realizar un ensayo con monolito de gel de sílice convencional para poder comparar la diferencia entre el coeficiente de difusión en la disolución y el del monolito, y tener una referencia para ver si los modificadores de red mejoran la difusión dentro de la matriz de sílice. Medir la actividad catalítica de la ALP encapsulada en monolitos de gel de sílice con los modificadores de red orgánicos que mejor respuesta hayan dado, y compararla con la actividad catalítica de la enzima en el gel de sílice convencional.

Palabras clave: voltamperometría cíclica, matriz de sílice, biosensor, ALP, modificador de red.

Abstract:

In the present study, the synthesis of silica monoliths for use in electrochemical biosensors has been carried out. The functionalization of the silica gel with organic network modifiers is proposed, which in this case are methyl and phenyl groups. The objective is to ensure that the analyte diffuses more quickly towards the bioreceptor, thus producing a better response from the biosensor.

The biosensor is based on the response as a bioreceptor of an enzyme that is capable of catalyzing phosphate group hydrolysis reactions, alkaline phosphatase (ALP); for this reason, the chosen substrate is hydroquinone diphosphate (HQDP), since after the aforementioned hydrolysis, hydroquinone is formed, this being an electrochemically active species, which can be measured with the help of amperometric techniques. As part of the process, both single-crystal electrodes of polyoriented platinum and screen-printed carbon have been used. In addition, a previous characterization of hydroquinone (HQ) in solution was carried out, both in an acid medium and in a basic medium.

To carry out this work, a Sol-Gel synthesis was carried out with the aim of preparing silica gel monoliths and testing the different network modifiers by adding HQ, and measuring their response by cyclic voltammetry. Next, the modifiers that gave the best response were tested in the marine environment, where the ALP encapsulated inside the silica matrix. Finally, HQDP was added to check its response with the help of cyclic voltammetry.

The objectives of this study are focused on characterizing the electrochemical activity of hydroquinone to calculate its diffusion coefficient and its heterogeneous transfer constant in a basic solution. Carry out a test with a conventional silica gel monolith to be able to compare the difference between the diffusion coefficient in the solution and that of the monolith, and have a reference to see if the network modifiers improve the diffusion within the silica matrix. Measure the catalytic activity of ALP encapsulated in silica gel monoliths with the organic network modifiers that have given the best response, and compare it with the catalytic activity of the enzyme in conventional silica gel.

Keywords: cyclic voltammetry; silica matrix; biosensor; ALP; network modifiers

ÍNDICE

1.Introducción	1
1.1 Objetivos.....	5
2. Material y métodos.....	7
2.1 Reactivos y material utilizado.....	7
2.1.1 Reactivos	7
2.1.2 Material	7
2.2 Métodos.....	9
2.2.1 Preparación de disoluciones.....	9
2.2.2 Preparación del monolito de Sol-Gel.....	10
2.2.4 Encapsulación de la ALP.....	12
2.2.5 Voltamperometría Cíclica.....	12
2.3 Procedimiento experimental.....	14
2.3.1 Experimentos en disolución.....	14
2.3.2 Ensayos con monolitos.....	15
2.3.3 Pruebas con el biosensor de ALP.....	16
2.4 Cálculos.....	16
3. Resultados	22
3.1. Caracterización electroquímica de la hidroquinona.....	22
3.1.1 Medio ácido.....	22
3.1.2 Disolución Tris.....	26
3.2 Caracterización de monolitos de sílice.....	29
3.2.1 Monolito convencional.....	29
3.2.2 Modificación de la estructura de gel de sílice modificada con metilos.....	32
3.2.3 Modificación de la estructura de gel de sílice con fenilos.....	37
3.3. Caracterización del biosensor de ALP	40
3.3.1 Biosensor fabricado en sílice convencional.....	40

3.3.2 Biosensor fabricado en sílice modificada con grupos fenilos.....	42
4.Conclusiones	44
5.Bibliografía	45
6. Anexo	49

1.Introducción

En la actualidad, la contaminación marina es uno de los temas que más preocupa al ser humano, ya que puede llegar a ser un riesgo para la salud humana y para el medioambiente.¹ Las principales actividades antropogénicas que presentan una amenaza para el medio marino es la modificación de la costa debido al aumento de población, o actividades como la pesca, la explotación de la industria petrolera.²

Uno de los grandes problemas de contaminación marina es la eutrofización, que consiste en un aumento de nutrientes en los reservorios de aguas, debido a los vertidos de fertilizantes y aguas residuales. Esto lleva a un aumento de: las comunidades de algas, del oxígeno disponible, de la concentración total del fósforo, y del carbón orgánico total.³ Un claro ejemplo de este problema se encuentra en los recientes acontecimientos que generaron una alerta medioambiental en el Mar Menor, que se encuentra en la provincia de Murcia⁴.

Todos estos problemas medioambientales necesitan ser detectados para poder solucionarlos, para ello, son necesarios los biosensores, pero antes de hablar de ellos es necesario refrescar el concepto de lo que es un sensor químico.

Un sensor químico es un dispositivo que tiene la capacidad de detectar especies químicas en su entorno. El aparato está compuesto por un receptor y un transductor, los receptores pueden ser biológicos⁵.

Partiendo de esa definición, un biosensor sería un dispositivo que utiliza un receptor de carácter biológico y que usa reacciones bioquímicas llevadas a cabo por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o cualquier tipo de célula que tenga la capacidad de detectar compuestos y generar señales eléctricas, térmicas u ópticas mediante un transductor adecuado.⁶

Existe una gran variedad de biosensores, ya que estos se pueden clasificar según el tipo de transductor y de bioreceptor, tal y como se muestra en la siguiente figura:⁷

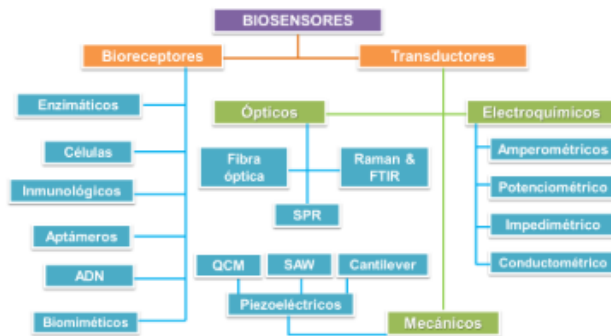


Figura 1: Tipos de biosensores según su bioreceptor y su transductor.

Se puede apreciar en la Figura 1 como existen 6 categorías diferentes de biorreceptores, y 3 tipos distintos de transductores, teniendo cada uno, subtipos diferentes.

Se va a trabajar con un biosensor basado en la inhibición de la fosfatasa alcalina, que utiliza como bioreceptor esta enzima, y su transductor es electroquímico, concretamente amperométrico.

Las enzimas fueron los primeros elementos que se reconocieron como utilizables en biosensores, tienen capacidad para medir la inhibición o la catálisis por medio de un sustrato específico. En la actualidad tienen varios usos como la determinación de contaminantes tanto en alimentos como en el medioambiente.⁷ Los transductores eléctricos se caracteriza por poder transformar el evento de reconocimiento molecular entre enzima y sustrato en una señal eléctrica que se puede cuantificar.⁸

Según el NC-IUBMB (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular) existen hasta 7 clases de enzimas diferentes, según sea el tipo de reacción que catalicen⁹:

- Clase 1 u Oxidorreductasas: Se encargan de catalizar reacciones de oxidorreducción, oxidando un sustrato considerado como donante de H. Un ejemplo son las deshidrogenasas.
- Clase 2 o Transferasas: Son enzimas que transfieren grupos funcionales a otras sustancias receptoras. Un ejemplo es la enzima glucoquinasa.
- Clase 3 o Hidrolasas: Catalizan reacciones de hidrólisis. Un ejemplo de enzima es la Fosfatasa Alcalina (ALP)
- Clase 4 o Liasas: Se caracterizan por catalizar la ruptura o soldadura de los sustratos. Un ejemplo sería el acetato descarboxilasa.
- Clase 5 o Isomerasas: Son enzimas que catalizan la interconversión de isómeros,

convirtiendo una molécula en su variante geométrica tridimensional. Un ejemplo es la alanina racemasa.

- Clase 6 o Ligasas: Catalizan reacciones específicas de unión de sustratos, mediante hidrólisis simultánea de nucleótidos de trifosfato. Un ejemplo es el piruvato carboxilasa.
- Clase 7 o Translocasas: Son proteínas integrales de membrana que transfieren un sustrato desde el lado 1 al lado 2 de una membrana.

Los transductores eléctricos se pueden llegar a cuantificar gracias a medidas electroquímicas, que son muy usadas para desarrollar biosensores, ya que son técnicas de medida versátiles, rápidas, poco costosas y con altas sensibilidad y selectividad. En la actualidad hay una gran cantidad de biosensores electroquímicos que se miden con potenciometría, voltamperometría o cronoamperometría.¹⁰

Una de las técnicas que se han desarrollado es la potenciometría para su uso en electrodos selectivos de iones, basados en una membrana polimérica que contiene transportadores sin carga o con carga.¹¹ En la actualidad se han realizado muchos esfuerzos para poder incorporar biorreceptores en las membranas poliméricas y así poder detectar compuestos iónicos en muestras medioambientales.¹²

Otra técnica en la que se ha trabajado recientemente es en la inmovilización del bioreceptor en zeolitas. Las zeolitas son micro y nanopartículas basadas en una red estructuras cristalinas que están formadas por átomos de oxígeno, aluminio y silicio, lo que hace que tenga carga negativa, pero se neutraliza añadiendo cationes en sus poros. Para que funcione el biosensor lo que se hace es inmovilizar al bioreceptor, normalmente una enzima que tenga transductores de conductimetría, o amperometría y se sumerge en una disolución que contenga el sustrato.¹³

Una técnica diferente sería la de utilizar biosensores con transductores potenciométricos empleando como técnica la potenciometría, en ella el bioreceptor se encapsula en monocapas, hidrogel, o membranas poliméricas.¹⁰ Lo que ocurre en esta técnica es que el biosensor enzimático lleva a cabo una reacción, en la que se mide el potencial generado por la reacción, en base a un electrodo de referencia.¹⁴

La mayoría de técnicas de fabricación de biosensores para análisis pasa por encapsular la enzima, esto se puede hacer utilizando diferentes materiales que hagan de matriz, y utilizando diferentes técnicas, de manera que se utilicen técnicas como atrapamiento físico, adsorción, o enlaces covalentes a la matriz. La encapsulación presenta diversas ventajas prácticas, como una recuperación más fácil para aplicaciones en catálisis, y

permite a la enzima reutilizarse y previene la degradación en condiciones desfavorables, gracias a que se incrusta en la estructura.¹⁵

Uno de los métodos de encapsulación más utilizados es la encapsulación mediante monocapas, según la IUPAC se define como una única capa de átomos, o moléculas que se encuentran muy cerca uno del otro.¹⁶ Uno de los métodos más utilizados para la formación de monocapas y la encapsulación del biosensor es utilizar una monocapa de oro y añadirle una molécula que tenga dos grupos tiol, uno al inicio, para unirse al monocapa, y otro al final para poder unir el bioreceptor de manera covalente. Para aumentar la estabilidad se utilizan grupos tiol polidentados para aumentar el número de enlaces Au-S. También se pueden utilizar otros metales nobles como Ag, Cu, Pd, Pt o Hg.¹⁷

Otro método utilizado es la encapsulación en hidrogel, la IUPAC lo define como: un gel en el que el agente que lo hace crecer es agua, y la red está formada por un polímero o por un coloide.¹⁸ Un ejemplo de hidrogel utilizado es el *Guar Gum* (GC), se trata de un polisacárido proveniente de la semilla de *Cyamopsis tetraganlobus*. Está compuesto por una cadena lineal de D-manosa conectados por enlaces (1→4)-β-glucosídicos, que pueden tener residuos de galactosa unidos mediante enlaces (1→6)-α-glucosídicos, y para formar el hidrogel se hace reaccionar con DMAP en medio acuoso.¹⁹

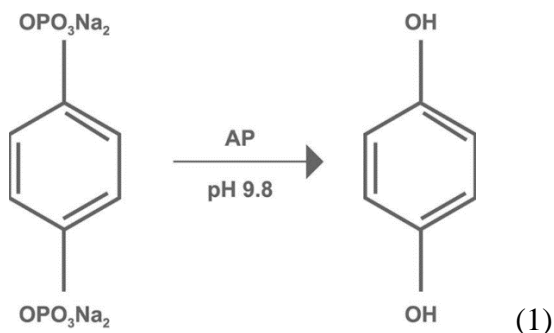
Otro ejemplo de material que se utilice para encapsular biomoléculas es utilizar gel de sílice, que se basa en la síntesis de SiO₂ mediante el proceso de Sol-Gel, en el que se forma un red en la que se pasa progresivamente de líquido a sol (dispersión coloidal), y por último a gel.¹⁸ En este tipo de matrices los bioreceptores más utilizados son los de carácter enzimático, en los que se inmoviliza la enzima manteniendo su actividad catalítica. El método Sol-Gel tiene muchas ventajas como que se pueden encapsular enzimas en condiciones suaves, y de esta manera las enzimas son más estables a temperaturas elevadas o condiciones químicas agresivas. Pero también tienen ciertas desventajas como que la red debe ser porosa para permitir a los sustratos poder difundir.²⁰

En este trabajo se va a trabajar con una matriz de sílice preparada por el método de Sol-Gel, en el que el líquido precursor es TEOS, se acidifica y se hidroliza para formar el sol, y por último para formar el gel se aumenta el pH del medio con disolución Tris a un pH de 8.22.²¹ Para mejorar el problema de la difusión del sustrato se van a probar modificadores de red orgánicos que genere huecos y de esa manera el sustrato pueda difundir de forma más eficiente.

La enzima que se va a utilizar en el biosensor es la fosfatasa alcalina (ALP), que basa

su actividad es catalizar reacciones de hidrólisis de un enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico.²²

El sustrato que se va a emplear es difosfato hidroquinona (HQDP), y el producto que se obtiene es hidroquinona, que es electroquímicamente activo, y por ello la técnica que se va a emplear para su análisis es la voltamperometría cíclica. La reacción de hidrólisis de la HQDP es la siguiente²³:



El uso de la fosfatasa alcalina como bioreceptor está justificado gracias al trabajo realizado anteriormente en el grupo de investigación²¹⁻²⁴, donde se llegó a la conclusión de que sirve para la determinación de fosfatos en agua de mar debido a que esta especie inhibe la actividad de la ALP, y la presencia de fosfatos en medio marino suele estar relacionada con fenómenos de eutrofización.

1.1 Objetivos.

La finalidad del presente estudio es la modificación de la estructura de gel de sílice en la que se encapsula la enzima fosfatasa alcalina (ALP) para desarrollar un biosensor. Para conseguir una mayor respuesta de la enzima y aumentar así su eficacia como biosensor en medios marinos, se persigue modificar el gel de sílice para mejorar el acceso de sustrato al bioreceptor. Para lograr dicho objetivo se hará uso de la voltamperometría cíclica, ya que el transductor del biosensor es de tipo electroquímico.

Los procesos llevados a cabo durante la realización de este experimento y que permitirán una mejora en la respuesta de la ALP se enumeran y describen a continuación:

1. Caracterización de la HQ en distintos medios con electrodos de trabajo de platino y serigrafiado de carbono.
2. Fabricación de monolitos de hidrogel de sílice y estudio de la respuesta electroquímica de HQ en este monolito.
3. Pruebas de modificación de la estructura del monolito de sílice con diferentes

modificadores de red grupos metilo y fenilo en diferentes porcentajes.

4. Desarrollo de un biosensor de ALP encapsulada en sílice con los mejores modificadores de red.

2. Material y métodos

2.1 Reactivos y material utilizado

2.1.1 Reactivos

Los reactivos que se han utilizado para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1: listado de reactivos, su procedencia la pureza y su especificación

Reactivo	Casa comercial	Pureza (%)	Especificación
Tetraetoxisilano	Sigma Aldrich	≥ 99	Para síntesis
Trietoximetilsilano	Sigma Aldrich	99	Para síntesis
Trietoxifenilsilano	Sigma Aldrich	≥ 98	Para síntesis
Ácido clorhídrico	Applichem	37	Para análisis
Ácido sulfúrico	NORMAPUR	95	Para síntesis
Fosfatasa alcalina	Sigma Aldrich	≥ 2.000 <i>DEA</i> Units/mg proteína	De mucosa intestinal bovina
Hidroquinona	Sigma Aldrich	≥ 99	Reactivo Plus
Difosfato hidroquinona	Metrohm Dropsens	≥ 99	-
Tris hidroximetil aminometano (Tris)	Sigma Aldrich	≥ 99	Cristalino

2.1.2 Material

Como materiales cabe destacar el uso del electrodo Dropsens C110, que es un electrodo serigrafado de carbono que contiene los 3 electrodos necesarios, el de trabajo, referencia y contra; además de tener un conector para cada uno, tal y como se muestra en la Figura 2²¹; también se usaron otros electrodos como: electrodo de trabajo platino monocristalino, contraelectrodo de platino, y electrodo de referencia de Pt/H₂.

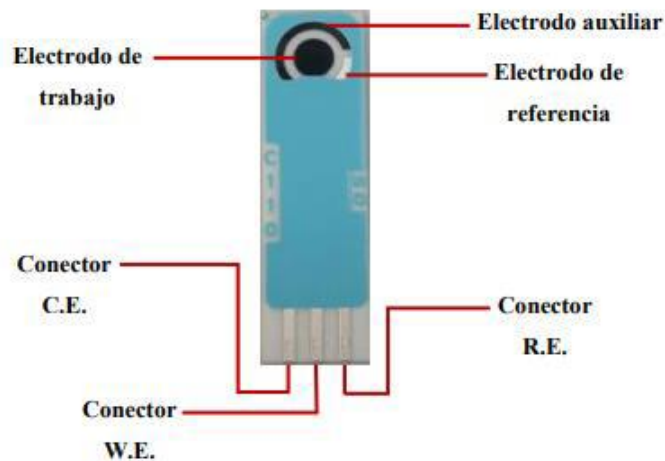


Figura 2: Descripción de un electrodo serigrafiado de carbono Dropsens.

En este caso, tanto el electrodo de trabajo, cuya área es de 0.1257 cm^2 , como el contraelectrodo son de carbono, y el electrodo de referencia se trata de un electrodo de pseudoreferencia de Ag. Estos electrodos el problema que tienen es que solo sirven para una medida y pueden sufrir degradaciones durante las medidas.

El electrodo de platino monocristalino, de área de 0.2189 cm^2 , que se usaba como electrodo de trabajo; como contraelectrodo se utilizaba un filamento de platino enrollado para que una gran área; y por último se utilizaba como electrodo de referencia un electrodo de Pt/hidrógeno, al que se le burbujeaba H_2 .

Los electrodos de platino necesitan ser limpiados antes de su uso, por ello antes de utilizarlos se trataban térmicamente con la ayuda de un mechero Bunsen, llevándolos hasta un color rojo vivo, y después introduciéndolos en agua ultrapura.

Para las mediciones electroquímicas se necesitaron una serie de aparatos para poder realizarlas:

- Potenciostato eDAQ.
- Generador de ondas EG&G Princeton Applied Research.
- Cable conector para electrodos serigrafiados modelo DRP-CAST (Dropsens).
- Cubeta de fluorescencia de plástico de 4 mL de capacidad.

La forma de colocarlos correctamente para las medidas es conectando el potenciostato al generador de ondas, que se conectan al electrodo serigrafiado de carbono mediante el conector, ya que este está dentro de la cubeta de fluorescencia, tal y como se muestra en la Figura 3.

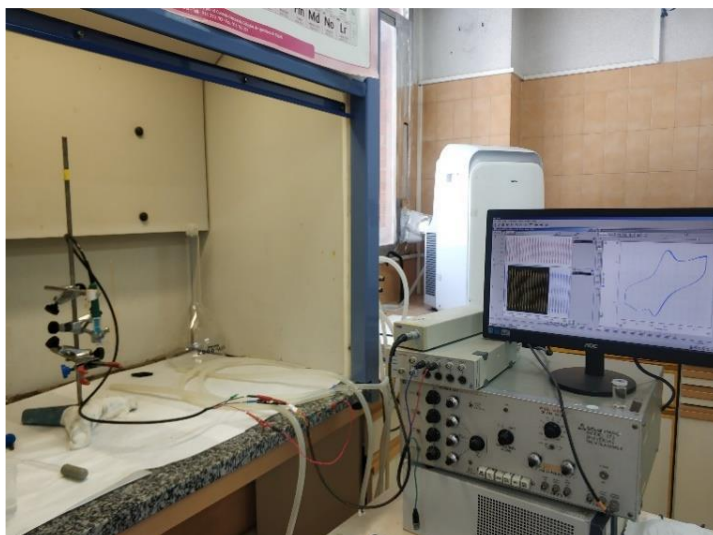


Figura 3: Montaje experimental para las medidas electroquímicas.

En la imagen anterior se puede apreciar cómo es un montaje para una medición de un voltamperograma cíclico.

2.2 Métodos.

2.2.1 Preparación de disoluciones.

A lo largo de todo el procedimiento experimental que se siguió, se llegaron a preparar tres tipos de disoluciones distintas, una fue la disolución tampón de Tris con un pH de 8,22, otra fue una disolución de agua marina, y la última fue la disolución que contiene a la enzima Fosfatasa alcalina (ALP). Los métodos que se usaron para cada una fueron los siguientes:

- Preparación de la disolución de Tampón Tris.

La disolución del tampón Tris tiene dos componentes 3.5% en masa de NaCl y 50 mM de Tris.

Como el pH es demasiado básico, se añaden gotas de HCl concentrado hasta rebajarlo a 8.22.

- Preparación de la disolución de agua de mar.

Para preparar el agua de mar sintética se sigue la receta de Kester et al., (1976)²⁵ donde para preparar 2 L se añadieron las siguientes cantidades de sales recogidas en la Tabla 2. El agua que se usó es agua ultrapura, y estuvo todo el proceso de adición de sales en agitación.

Tabla 2: Masas de sales añadidas para preparar el agua de mar sintética

Sales	Masa (g)
NaCl	49.594
Na ₂ SO ₄	8.308
KCl	0.702
NaHCO ₃	0.4
KBr	0.406
H ₃ BO ₃	0.054
NaF	0.062
MgCl ₂ · 6H ₂ O	21.552
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3.148
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	0.05

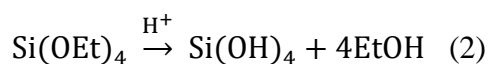
- Preparación de la disolución de ALP.

Para la posterior encapsulación de la enzima de ALP se requiere preparar una disolución que contenga una concentración 24 µM de fosfatasa alcalina. Para ello a 50 mL de agua ultrapura se añadieron 0.192 g de la enzima y se disolvieron. Para una mejor conservación esta disolución se guardó en la nevera.

2.2.2 Preparación del monolito de Sol-Gel.

Para las mediciones electroquímicas de biosensores se utilizó el método del monolito de gel de sílice preparado mediante síntesis de Sol-Gel que se emplea en el siguiente artículo (Cho et al., 1994)²⁶.

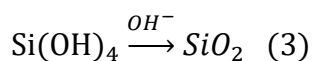
Se utilizan 6 mL de tetraetoxisilano (TEOS) que en medio ácido (HCl 0.01 M) se hidroliza y forma el tetrasilanol y etanol como subproducto. Como se puede ver en la siguiente reacción.



Para obtener el tetrasilanol se mezclan el TEOS y el HCl y se dejan en agitación 2 horas hasta que se forme solo una fase. Posteriormente se procede a eliminar el etanol que se obtiene como subproducto, para ello se utiliza el rotavapor y se hace por pesada hasta que se elimine la cantidad de etanol formada teóricamente.

Por último, para formar el monolito de sílice en una cubeta de plástico, en la cual con anterioridad de ha fijado un electrodo serigrafiado de carbono con la ayuda de la resina epoxi, llevando mucho cuidado con no dañar ni las conexiones ni los electrodos, se añade 1.3 mL de disolución de tetrasilanol con 1.3 mL de disolución de Tris 50 mM y 3.5% de

NaCl. Formando así una red de sílice, ya que al ser una disolución básica el tetrasilanol se desprotona y forma la red tridimensional con enlaces O-Si. Cómo se puede ver en la siguiente reacción:



Para hacerse una idea de la estructura en las tres dimensiones del espacio con la Figura de (López, 2017)²⁷:

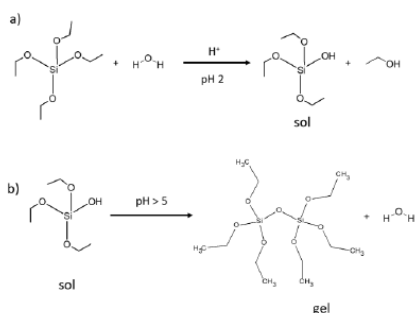


Figura 4: Estructura tridimensional de la sílice

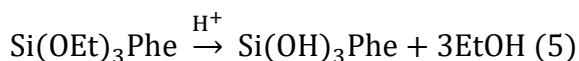
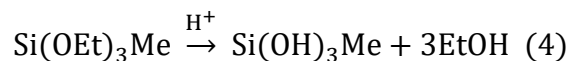
Una vez haya gelificado, se procede a lavar el monolito con la disolución de Tris 50 mM y 3.5% de NaCl.

Para finalizar el montaje, se añade 1.2 mL de HQ en disolución Trizma 50 mM y 3.5% NaCl con la idea que la concentración en todo el volumen sea de 1 mM en HQ, y se deja estabilizar, de manera que la hidroquinona difunda al largo del monolito de sílice.

2.2.3 Modificación de la estructura del monolito de sílice.

Uno de los objetivos de este trabajo es modificar la estructura del gel de sílice con modificadores de red orgánicos con el fin de obtener una mejor respuesta del biosensor. Para ello, lo que se hace es añadir un porcentaje de modificadores de red, de esta manera se consigue generar huecos en la matriz de sílice para que el sustrato difunda más rápido.

Los modificadores de red que se utilizan son el trietoximetilsilano, y el trietoxifenilsilano, que reaccionan de la siguiente manera para hidrolizarse:



De esta manera, cuando se condensa el TEOS hidrolizado se forma la red de sílice se generan poros en los lugares donde haya un metilo, o fenilo, en lugar de un grupo

hidroxilo. Las diferentes proporciones probadas para cada modificador se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3: Ensayos con los distintos modificadores.

Modificador de red	mL Modificador	mL TEOS	% en volumen
Si(OEt) ₃ Me	0.3	5.7	5
Si(OEt) ₃ Me	0.6	5.4	10
Si(OEt) ₃ Me	1.2	4.8	20
Si(OEt) ₃ Me	1.8	4.2	30
Si(OEt) ₃ Phe	0.3	5.7	5
Si(OEt) ₃ Phe	0.6	5.4	10

2.2.4 Encapsulación de la ALP.

Para encapsular la fosfatasa alcalina dentro del gel de sílice se le añade a 1.2 mL de TEOS hidrolizado (o del TEOS con el modificador correspondiente a cada ensayo). 1.2 mL de tampón Tris 100 mM con ALP 24 μ M, y se homogeniza la mezcla de forma rápida con la ayuda de una pipeta Pasteur, ya que tras 30 segundos aproximadamente gelifica la mezcla. Una vez gelificada la mezcla se proceden a los lavados, añadiendo 1 mL de agua de mar durante 30 segundos para eliminar el tampón. Este proceso se repite 5 veces.

2.2.5 Voltamperometría Cíclica.

Todos los experimentos que se realizaron durante la realización de este trabajo de fin de grado se midieron con una técnica electroquímica, concretamente con la voltamperometría cíclica.

La voltamperometría cíclica permite el análisis de los procesos que ocurren en la superficie del electrodo de trabajo, que debe estar sumergido en un electrolito. La información que dan estas técnicas viene dada por la corriente eléctrica (I), que pasa a través del electrodo de trabajo, a un estímulo, en un determinado tiempo.

El estímulo que se aplica es una diferencia de potencial (ΔE) respecto a otro electrodo, no polarizable, que es el de referencia. La corriente que se mide sobre el electrodo de trabajo puede tener doble origen, ya que puede proceder de la migración de iones para compensar cargas fijas en la superficie del electrodo (fenómenos capacitativos), o moléculas que experimentan una reacción de oxidación-reducción como resultado del potencial electroquímico aplicado (fenómenos farádicos).²⁸

La voltamperometría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más empleadas por su sencillez operacional y la cantidad de información que se puede obtener con un simple voltamperograma. Se trata de un método potenciodinámico en el que el potencial que se aplica al electrodo de trabajo es variado a una velocidad constante entre dos valores límite de potencial.

En un experimento de voltamperometría cíclica típico²⁹ se aplica un potencial que varía en función del tiempo según

$$E = E_0 \pm vt \quad (6)$$

Donde E es el potencial, E_0 es el potencial inicial que se aplica, v es la velocidad de barrido y t es el tiempo.

Inicialmente, el potencial que se aplica sobre el electrodo se selecciona de manera que no se produzca ningún proceso faradaico, como la formación de H_2 , o la descomposición del agua³⁰. A continuación, el sistema se polariza entre dos límites de potenciales, el límite superior, que es el mayor valor del potencial que se alcanza, y límite inferior, que es el valor más bajo que alcanza la corriente. Una vez que se realiza el barrido de potencial, la corriente se detecta y se registra frente al potencial del electrodo de trabajo.

La respuesta típica de un proceso farádico de una especie en disolución se muestra en la Figura 5.

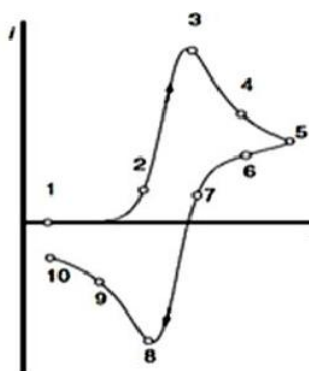
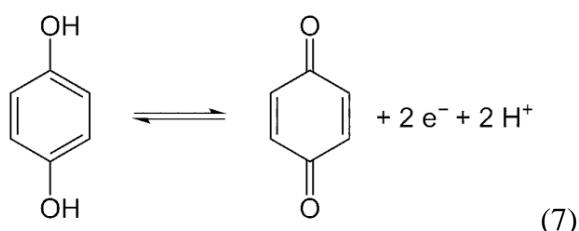


Figura 5: Voltamperograma típico de una especie redox

Como se aprecia en la Figura 5 la corriente aumenta a medida que aumenta el potencial aplicado hasta que se alcanza el máximo de gradiente de concentración para la especie reactiva, que es el que determina la velocidad a la que difunden las moléculas hacia la superficie. En el máximo la concentración de la especie electroactiva desciende a cero en

la superficie del electrodo, mientras que el gradiente comienza a disminuir por la falta de esa especie cerca del electrodo. En el barrido catódico el entorno se ha enriquecido de la especie oxidada, por ello cuando se invierte el barrido se produce una corriente negativa, tal y como se observa en el voltamperograma.³¹

En el caso de este trabajo la especie que se ha estudiado es la hidroquinona, y su reacción electroquímica es:



Para la representación de los voltamperogramas se utiliza el software eDAQ Chart, el cual recoge los datos tanto de la intensidad de corriente, como del potencial, y del tiempo. Lo que permite realizar representaciones de amperogramas (t frente a I), de voltagramas (t frente a E), y de voltamperogramas (E frente a I). Que a este último es el que se obtiene en la voltamperometría cíclica.

2.3 Procedimiento experimental.

2.3.1 Experimentos en disolución.

Para la caracterización de la hidroquinona se decidió medir su respuesta en disolución.

Se probó en 2 tipos de disoluciones distintas, la primera en medio ácido, 0.5M de H₂SO₄, y la otra en medio básico, utilizando disolución de tampón Tris. Los electrodos que se utilizaron fueron de monocristal de platino poliorientado (solo en medio ácido) y el electrodo serigrafiado de carbono.

El objetivo es medir la constante de difusión y compararla con la bibliografía. En estos ensayos se necesita atmósfera inerte dentro de la disolución, por ello se burbujea N₂ para quitar el O₂ disuelto que pueda haber.

Los diferentes montajes que se realizaron para estos experimentos están recogidos en la Figura 6.

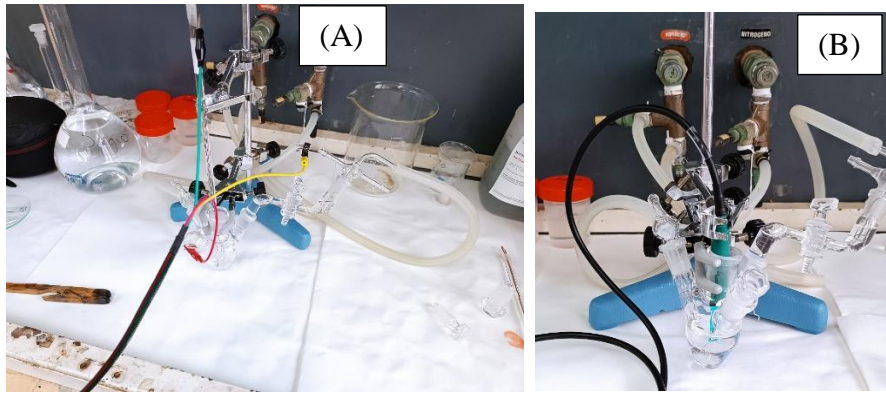


Figura 6: Montaje de la celda electroquímica para electrodo de platino (A); y para electrodo serigrafado de carbono (B).

2.3.2 Ensayos con monolitos.

Una vez que se caracterizó la hidroquinona en disolución se pasó a medir la respuesta del monolito convencional para tener una referencia en forma de blanco.

Además de probar la respuesta de los monolitos de gel de sílice convencional con los modificadores de red que se muestran en la Tabla 3.

En este tipo de ensayos se añadía 1.3 mL de TEOS hidrolizado (y con los correspondientes modificadores y sus concentraciones) y otros 1,3 mL de disolución de tampón Tris, y una vez que se formaba el Sol-Gel se realizaban los 5 lavados con H₂O ultrapura para retirar el exceso de la disolución de NaCl y Tris, y se añadía 1 mL de HQ para que la concentración del monolito fuera de 1 mM.

El montaje para estos ensayos se puede ver en la Figura 7:



Figura 7: Montaje experimental monolito Sol-Gel.

2.3.3 Pruebas con el biosensor de ALP

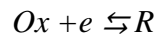
Una vez comprobados que modificadores de red orgánicos mejoran las características del monolito convencional se probaron con una muestra de agua de mar sintética y con fosfatasa alcalina (ALP) como bioreceptor y como sustrato se utiliza difosfato hidroquinona (HQDP).

Primero se realizó la encapsulación de la fosfatasa alcalina dentro de la matriz de sílice y se añade el sustrato, para la enzima la disolución se preparó con agua de mar y utilizando HQDP como sustrato. Se sigue añadiendo 1 mL de la disolución y se busca que la concentración en todo el monolito sea de 1 mM

En esta clase de experimentos lo que interesa es medir la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina, por ello se dejaron durante aproximadamente más de una hora cada ensayo y se midió su intensidad cada 10 minutos.

2.4 Cálculos

Tenemos una disolución que contiene un par redox cuyo potencial de equilibrio es E_{eq} :



Si sumergimos un electrodo al mismo potencial de equilibrio de este par redox ($E=E_{eq}$), la reacción directa (reducción) e inversa (oxidación) se darán a la misma velocidad. En esta situación, la velocidad de la reacción global será cero, o lo que es lo mismo, la corriente que pasa a través del electrodo será $I=0$ A.

Hablaremos, por simplicidad, de la reacción de oxidación, pero sería equivalente para la reacción inversa (reducción). Se aplicamos un potencial al electrodo mayor que el potencial de equilibrio ($E>E_{eq}$) produciremos la reacción de oxidación sobre el electrodo ($R \rightarrow Ox + e$), la velocidad de la reacción aumentará y se observará, en consecuencia, una corriente positiva ($i > 0$). La velocidad (o la corriente del proceso) aumentará cuanto mayor sea la diferencia entre el potencial aplicado y el potencial de equilibrio.

Se puede demostrar que la dependencia de la corriente del proceso de oxidación con el potencial aplicado sigue la ecuación de Butler-Volmer. Esta ecuación relaciona la densidad de corriente (j , que es la corriente por unidad de área del electrodo, $A\ cm^{-2}$) con el potencial aplicado:

$$j = j_0 \left[e^{\left(\frac{\alpha n F}{RT}(E-E_{eq})\right)} - e^{\left(-\frac{(1-\alpha)n F}{RT}(E-E_{eq})\right)} \right] \quad (8)$$

En esta ecuación no se tienen en cuenta efectos de transferencia de masa.

j_0 es la densidad de corriente de intercambio y α es el coeficiente de transferencia de

carga (no tiene unidades). Este coeficiente de transferencia es un factor de simetría relacionado con la barrera de energía del estado de transición entre la especie oxidada y reducida (se suele considerar igual a 0.5, proceso simétrico).

La densidad de corriente de intercambio, j_0 , es la velocidad de las reacción directa e inversa al potencial de equilibrio (cuando no hay reacción neta). Normalmente la densidad de corriente de intercambio depende del material del electrodo y se considera mejor material cuanto mayor sea su j_0 para una reacción concreta. La gráfica muestra una representación de la ecuación (8) para distintos valores de j_0 , donde se observa que cuanto mayor es j_0 más rápidamente se da la reacción (para el mismo sobrepotencial aplicado)

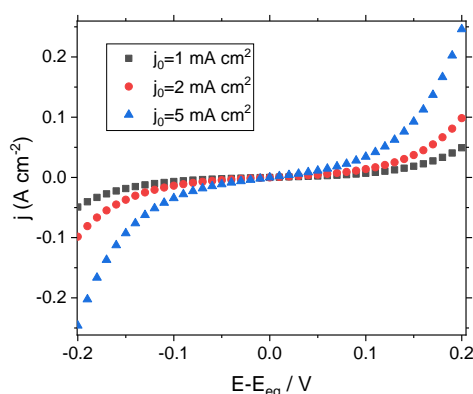


Figura 8: Representación de la ecuación de Butler-Volmer para distintos valores de j_0 .

Por tanto, j_0 está relacionada con la velocidad de transferencia de electrones entre el electrodo y la disolución. La velocidad a la que el electrón atraviesa la interfase se denomina **constante de transferencia heterogénea** k^0 (unidades cm s^{-1}) y su valor se relaciona con j_0 :

$$k^0 = \frac{j_0}{FC} \quad (9)$$

para $C=C_{Ox}=C_R$, que son las concentraciones de las especies Ox y R. Por tanto, k^0 es un parámetro característico del electrodo que informa sobre la calidad del mismo para una reacción redox que suceda en disolución.

La interpretación física de k^0 es sencilla y se puede entender como la velocidad a la que los electrones atraviesan la interfase electrodo/disolución. Los mayores valores de k^0 medidos están en torno a 1 y 10 cm s^{-1} y se asocian con procesos de transferencia de electrones sencillos en las que hay poca alteración en las formas de las moléculas cuando sufren el proceso redox, por ejemplos reducciones u oxidaciones de hidrocarburos aromáticos (como antracenos, pirenos y perilenos sustituidos) a los correspondientes radicales aniónicos y catiónicos o procesos de reducción de metales para formar

amalgamas sobre electrodos de mercurio.

Las reacciones que implican un reordenamiento molecular importante por la transferencia de electrones, como la reducción del oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno o agua, o la reducción de los protones a hidrógeno molecular, pueden ser muy lentas y dar lugar a k^0 con valores del orden de 10^{-9} cm/s.³²

Existen distintas formas de determinar k^0 , por ejemplo, con medidas amperométricas tanto potencioestáticas como potenciodinámicas. Aquí vamos a mostrar cómo se pueden determinar mediante medidas de voltametría cíclica para reacciones *cuasireversibles* (ver figura 9).

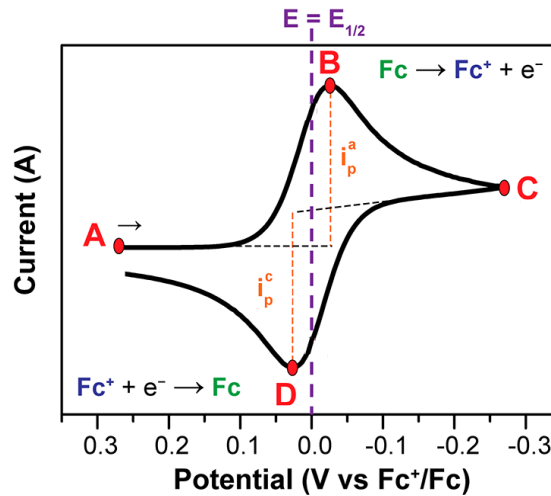


Figura 9: Voltagrama cíclico típico. Se marcan en la figura puntos específicos: (A) Potencial límite inferior; (B) Pico de oxidación, (E_p^a, i_p^a), (C) potencial límite superior; (D) Pico de reducción, (E_p^c, i_p^c). Se marca en la figura el $E_{1/2} = (E_p^a + E_p^c)/2$

En electroquímica se denominan procesos *reversibles* a aquellos que tienen comportamiento Nernstiano, es decir que la transferencia de carga es muy rápida ($k^0 \rightarrow \infty$). En esos casos, los voltamperogramas muestran un potencial de pico independiente de la velocidad de barrido (v), tienen una corriente de pico proporcional a $v^{1/2}$, la separación entre picos del proceso de oxidación y reducción es de $(59/n)$ mV y la corriente de pico es proporcional a la concentración de las especies.

Sin embargo, es más habitual encontrar reacciones redox *cuasireversibles*. Éstas presentan cierta limitación cinética en la transferencia electrónica y el valor de k^0 se puede determinar mediante voltametría cíclica a partir de la separación de picos del voltagrama. Esta separación entre picos se hace mayor que $(59/n)$ mV en procesos cuasireversibles. Para determinar k^0 utilizaremos el llamado método de Nicholson. En primer lugar, definimos el parámetro adimensional ψ (*psi*) como:

$$\psi = k^0 \left(\frac{RT}{\pi F D v} \right)^{1/2} \quad (10)$$

siendo D el coeficiente de difusión de la especie redox y v la velocidad de barrido del experimento de voltametría. Para determinar ψ hay que realizar un voltagrama donde se observen los procesos redox a partir de la separación de picos ($\Delta E_p = E_p^a - E_p^c$).

Los valores de ψ se encuentran tabulados en el artículo original de Nicholson³³ en función de una separación de picos para un proceso monoelectrónico y un $\alpha=0.5$. La Tabla 4 muestra esos valores para unos valores de separación de picos concretos. Si en nuestros experimentos tenemos otros valores de separación de pico no podremos usar esta tabla de forma directa.

Para poder determinar ψ cuando tenemos valores de separación de pico diferentes a los mostrados en la tabla, vamos a obtener una expresión analítica a partir de los datos de Nicholson. Realizamos primero una representación gráfica con los valores de ψ del artículo de Nicholson frente ΔE_p (figura 10). Los valores se han ajustado a una función de tipo racional.

Tabla 4: Valores del parámetro ψ en función de de la separación de picos volta métricos para un proceso monoelectrónico $\Delta E_p \times n$ a 25 °C. $\alpha=0.5$ ³³

$\Delta E_p \times n$	ψ
61	20
63	7
64	6
65	5
66	4
68	3
72	2
84	1
92	0.75
105	0.5
121	0.35
141	0.25
212	0.1

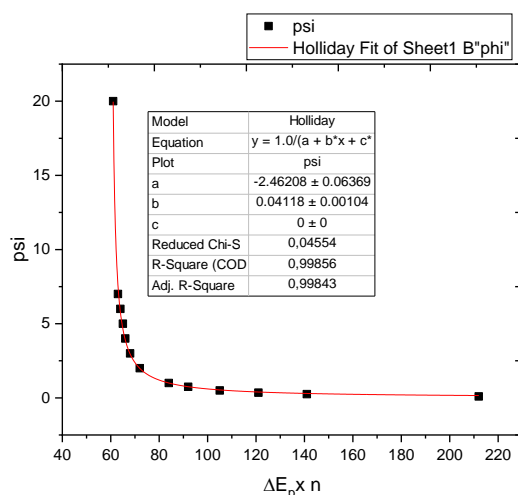


Figura 10: Representación de ψ frente a la separación de picos, datos de la tabla 1. Ajuste a una función racional del tipo $y=1/(a+bx)$

El ajuste proporciona la siguiente ecuación que nos permitirá establecer el valor de ψ para los valores de ΔE_p :

$$\psi = [0.0412 (\Delta E_p \times n) - 2.462]^{-1} \quad (11)$$

con ΔE_p en mV y n el número de electrones transferidos en la reacción redox. Solo es válida esta ecuación en el intervalo de ΔE_p tabulado en el artículo de Nicholson.

Para los casos en que existe una irreversibilidad alta (separación de picos >162 mV) ψ se determina mejor empleando la ecuación de Kingler-Kochi³⁴ reformulada por Lavagnini³⁵) válida para $(\Delta E_p \times n) > 0.163$ V:

$$\psi = 2.18 \left(\frac{\alpha}{\pi}\right)^{1/2} e^{\frac{\alpha^2 F}{RT}(\Delta E_p \times n)} \quad (12)$$

En esta ecuación $(\Delta E_p \times n)$ debe ser expresada en V. α usualmente se considera igual a 0.5. Una representación gráfica de $(1/\psi)$ frente a $v^{1/2}$ debe dar lugar a una recta cuya pendiente sería $\frac{1}{k^0} \left(\frac{\pi F D}{RT}\right)^{1/2}$ (ver la ec. 10).

Para poder calcular k^0 necesitamos también conocer el coeficiente de difusión (D) de la especie redox, podemos obtener el dato de la bibliografía (*Handbook*), pero también lo podemos obtener experimentalmente desde las medidas voltamétricas a distintas velocidades de barrido. Para ello empleamos la ecuación de Randles-Sevcik:

$$I_p^r = 269 \cdot n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (13)$$

para 25 °C, siendo I_p^r la corriente del pico del proceso reversible (en amperio), n el número de electrones transferido por molécula, A el área del electrodo (en cm²), C la concentración de especie redox (en mol/L), D el coeficiente de difusión (en cm² s⁻¹) y v

la velocidad de barrido (en $V s^{-1}$). Se realizan voltogramas a distintas velocidades de barrido y representando gráficamente la corriente de pico I_p frente a $v^{1/2}$ se obtiene una recta de cuya pendiente se obtendría D . Sin embargo, cuando el proceso es irreversible la corriente no es proporcional a la raíz de la velocidad de barrido, sino algo menor, por lo que hay que corregir la corriente.

La representación gráfica $(1/\psi)$ vs $v^{0.5}$ ajustarse a una recta lineal. Es posible que a valores altos de velocidad de barrido se obtengan desvíos de la linealidad a causa de la caída óhmica. Si esto es así seleccionar los rangos bajos de velocidad para el ajuste.

Con los valores de ψ se pueden corregir los valores de corriente experimentales.

Se obtiene $\lambda = \psi\sqrt{\pi}$. A partir de ese parámetro se determina $K(\lambda)$ empleando la siguiente ecuación:

$$K(\lambda) = 1 - \frac{0.213}{1 + e^{\frac{\log(\lambda) + 0.155}{0.333}}} \quad (14)$$

Esta ecuación es empírica y se ha obtenido ajustando la gráfica del Bard a una ecuación tipo Boltzmann.

Con los valores de $K(\lambda)$ se corrigen las corrientes experimentales para obtener los valores de corriente reversible:

$$I_{rev} = \frac{I}{K(\lambda)} \quad (15)$$

Se hace la representación de Randles-Sevcik (I_{rev} vs $v^{0.5}$), y de la pendiente de la recta corregida se saca el coeficiente de difusión con la ecuación (13).

Por último, de la gráfica $(1/\psi)$ vs $v^{0.5}$ se obtiene la pendiente que es $\frac{1}{k^0} \left(\frac{\pi FD}{RT} \right)^{1/2}$, y a partir de ella k^0 .

3. Resultados

3.1. Caracterización electroquímica de la hidroquinona.

3.1.1 Medio ácido.

En primer lugar se ha realizado el estudio de la respuesta electroquímica de la molécula hidroquinona en distintos medios, empleando distintos electrodos de trabajo.

La Figura 11 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en una célula “blanco” (en ausencia de hidroquinona) en medio H_2SO_4 0.5M.

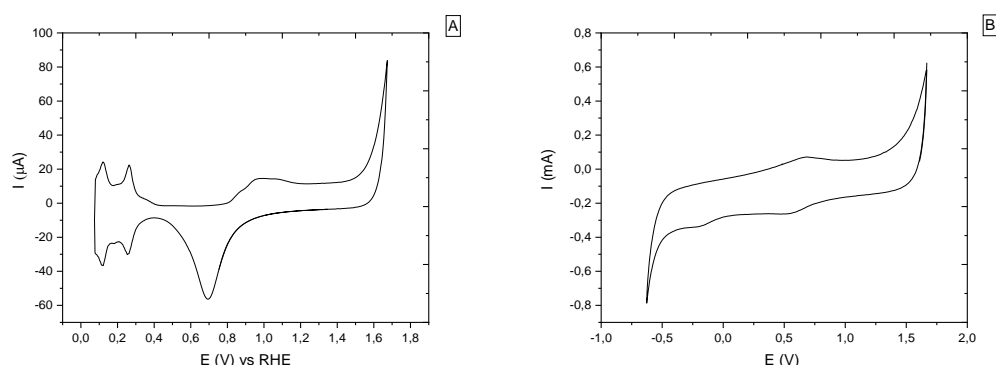


Figura 11: Voltamperogramas cíclicos estabilizados de electrodos (A) platino monocristal poliorientado y (B) electrodo serigrafiado de carbono con el referencia propio de Ag en disolución H_2SO_4 0.5M. Velocidad de barrido a 100 mV/s.

La figura 11.A muestra la respuesta de un electrodo de platino. Se comienza el barrido de potenciales a 0.50 V, hacia potenciales más positivos. A partir del potencial de 0.75 V se observa la aparición de una corriente positiva que se relaciona con el proceso de oxidación superficial (adsorción de oxígeno) en la superficie del platino. Cuando se llega a 1.70 V se observa un aumento de la corriente relacionada con el proceso de oxidación de agua para producir oxígeno gaseoso (Oxygen Evolution reaction, OER), una vez llegado a 1.70 V se invierte el sentido del barrido de potenciales y se observa un proceso de reducción con un pico a 0.69 V relacionado con el proceso de desorción de oxígeno superficial.

Al continuar barriendo hacia potenciales negativos se observa la aparición de picos de reducción, a potenciales de 0.26 y 0.12 V, procesos relacionados con la adsorción de hidrógeno en diferentes planos del electrodo de platino. Una vez se llega a 0.07 V se invierte el sentido del barrido de potencial. Se observa la aparición de picos de oxidación a 0.12 y 0.26 V que corresponde a la desorción del hidrógeno que se había adsorbido anteriormente.

En el voltamperograma realizado con un electrodo serigrafiado de carbono, se empieza a 0.00 V y se va en sentido positivo, donde a 0.70 V aparece un pico de oxidación relacionado con transiciones redox de la superficie del carbono, probablemente debido a especies de quinona superficiales³⁶. Si se sigue, se puede ver el pico perteneciente al comienzo de la reacción OER, que se produce a partir de 1.50 V. Cuando se llega a 1.50 V se invierte el sentido del potencial, aparece a 0.60 V un pico de reducción, que es el contraprocés de la oxidación observada a 0.70 V, al continuar bajando el valor del potencial aparece desde -0.50 V un proceso de reducción relacionado con la producción de HER.

La Figura 12 muestra el voltamperograma cíclico estabilizado obtenido en las mismas condiciones de la Figura 9 (medio de H₂SO₄ 0.5 M) en presencia de hidroquinona en una concentración de 3x10⁻⁴ M con electrodo de monocristal poliorientado de platino.

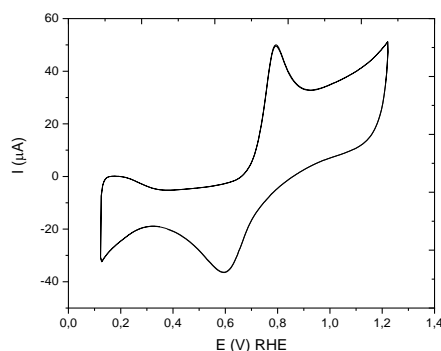


Figura 12: Voltamperograma cíclico estabilizado del electrodo de platino monocristal poliorientado en disolución 0.5M de H₂SO₄ en presencia de 0.3 mM de hidroquinona. Velocidad de barrido a 100 mV/s.

Se empieza en 0.50 V, y se va hacia potenciales positivos, a 0.80 V aparece el pico de la oxidación de la HQ para dar benzoquinona. Se invierte el sentido del barrido a 1.20 V de potencial hacia potenciales negativos, a 0.59 V se produce la reducción de benzoquinona a HQ (reacción 7).

La Figura 10 muestra los voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido del experimento en medio de ácido sulfúrico 0.5 M con electrodos de platino, en presencia de HQ. Las velocidades de barrido que se midieron fueron 20-50-100- 200-500 mV/s.

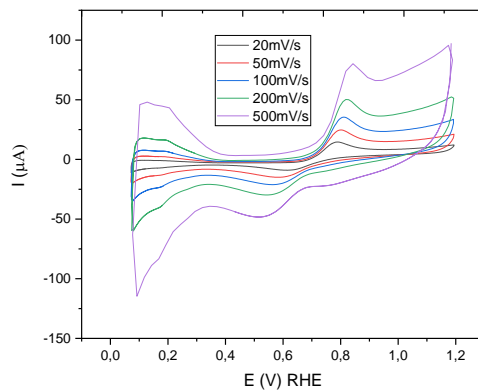


Figura 13: Voltamperogramas Cíclicos estabilizados en H_2SO_4 0.5M en presencia de HQ 0.3 mM con el electrodo de platino, a diferentes velocidades de barrido: 20-50-100-200-500 mV/s.

Se puede apreciar como en la Figura 13 a medida que se aumenta la velocidad de barrido aumenta también la intensidad de los picos de oxidación de la hidroquinona, y de reducción de la benzoquinona.

Para un proceso reversible en disolución se debe cumplir la ecuación Randles-Sevcik (ecuación 13); por ello en la Figura 14 se representa la intensidad corregida de los picos de oxidación corregida para los dos electrodos de trabajo utilizados frente a la velocidad de barrido. (Para el electrodo serigrafiado de carbono los resultados se encuentran en el Anexo).

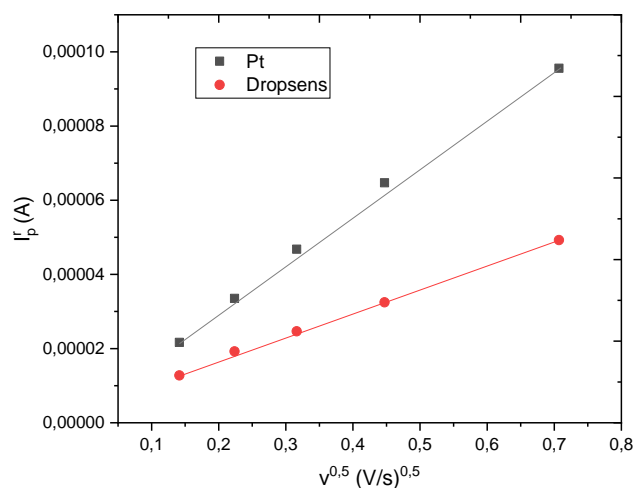


Figura 14: Representación de la intensidad corregida de los picos de oxidación de la hidroquinona de los voltamperogramas cíclicos frente a la raíz de la velocidad de barrido.

Como se puede apreciar en la Figura 14, las dos disoluciones obedecen la ecuación 13, la pendiente en ambos casos es diferente, debido a que son experimentos diferentes, y por ello tanto la concentración del analito, como el área del electrodo de trabajo cambian.

Ahora se calcula el coeficiente de difusión par cada caso, utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, despejando en cada caso con los datos de cada ensayo, que se recogen en la siguiente tabla. Esas variables vienen recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5: Condiciones experimentales para el cálculo del coeficiente de difusión en cada ensayo realizado en medio acuoso con H₂SO₄ como electrolito de soporte.

Electrodo de trabajo	Concentración HQ (M)	Área electrodo de trabajo (cm ²)	n	Pendiente de la representación (cm ³ xM/s ^{0.5})
Platino	3.806x10 ⁻⁵	0.2190	2	1.30x10 ⁻⁴
Dropsens	6.075x10 ⁻⁵	0.1257	2	6.00x10 ⁻⁵

Los resultados del coeficiente de difusión para cada ensayo y comparado con la bibliografía del Handbook de electroquímica³⁷; y del artículo de Eva Sramokova³⁸ (que es el que más similitudes se encuentran con las condiciones experimentales empleadas) vienen recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 6:Comparativa de los coeficientes de difusión de los ensayos con los de referencia bibliográfica. Todos de hidroquinona, en medio acuoso y usando como electrolito de soporte H₂SO₄, pero en los ensayos realizador a 0.5M, y la referencia bibliográfica a 0.1.

D _{Platino} (cm ² /s)	D _{Dropsens} (cm ² /s)	D _{Handbook} (cm ² /s)	D _{Sramokova} (cm ² /s)
4.24x10 ⁻⁶	1.20x10 ⁻⁶	7.30x10 ⁻⁶	9.30x10 ⁻⁶

Se puede observar que hay diferencia entre los coeficientes de difusión obtenidos a través de los experimentos realizados, el coeficiente del Handbook de electroquímica y el artículo de Sramokova. Esto es debido a que las condiciones experimentales de las referencias bibliográficas y las utilizadas en estos experimentos no coinciden, y por ello puede variar el valor del coeficiente de difusión.

Otro motivo por el que puede que no coincidan los valores es porque haya cierta diferencia entre el área real de los electrodos y la calculada a raíz del valor de diámetro del electrodo de C, ya que si se observa al microscopio el electrodo serigrafado de

carbono se pueden apreciar rugosidades que hacen que el valor del área real sea diferente del valor teórico.

Finalmente, como en voltamperometría cíclica existe una difusión plana, que se caracteriza por el agotamiento de la especie redox cerca del área del electrodo de trabajo, es posible que con el tiempo la intensidad del pico disminuya con el tiempo, por ello es de vital importancia que la reacción que sea reversible. Como en este sistema la reacción es cuasi-reversible, porque la separación de picos es mayor de 59 mV, la corriente máxima depende también de la constante de transferencia heterogénea, por ello no se puede obtener un valor del coeficiente de difusión fiable.

Sin embargo, se tratan de resultados que están dentro del orden, por lo que se toman como válidos.

3.1.2 Disolución Tris

Una vez caracterizada la hidroquinona en medio ácido se realizó un ensayo cambiando el medio a algo más parecido a lo que serían las condiciones de los monolitos de gel de sílice, por ello se utilizó como medio la disolución tampón Tris.

La figura 15 muestra dos voltamperogramas con electrodo de trabajo serigrafiado de carbono, en un medio de disolución tampón Tris. El voltamperograma A se obtuvo con la disolución; mientras que el B es después de adicionar HQ.

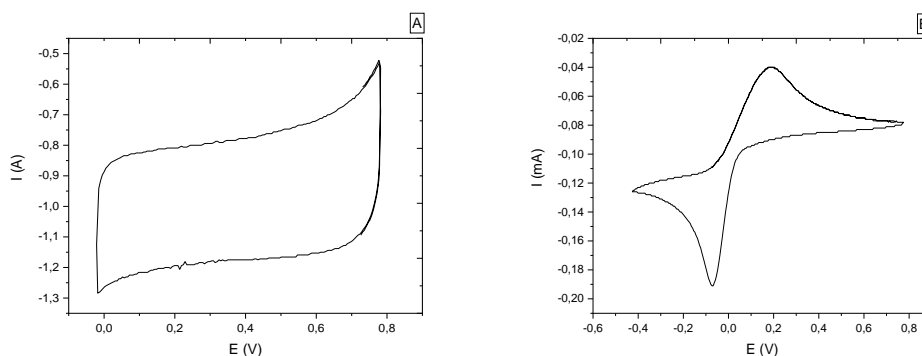


Figura 15: Voltamperogramas de la disolución tampón Tris a 100mV/s con electrodo serigrafiado de carbono. (A) sólo con la disolución blanco. (B) con hidroquinona 1 mM.

En la Figura 15.A se empieza el barrido de potencial 0.00 V y nos dirigimos hacia potenciales positivos, haciendo un incremento hasta 0.80 V. Se invierte el sentido del barrido de potencial hasta que se llega de nuevo a 0.00 V. Como se puede apreciar no ocurre ningún proceso en el intervalo de potenciales en los que se trabaja.

La Figura 15.B muestra el barrido del potencial una vez que se ha añadido la hidroquinona. El potencial inicial del barrido es de 0.00 V, y se dirige hacia potenciales positivos, encontrándonos en 0.19 V el pico de oxidación de HQ, y a 0.80 V, se invierte el sentido del barrido de potencial. En -0.07 V aparece un pico de corriente negativa, que corresponde a la reducción de la benzoquinona en hidroquinona; y en -0.40 se vuelve a cambiar el sentido del barrido de potencial.

La Figura 16 muestra el voltamperograma cíclico de la disolución de tampón Tris con electrodo serigrafiado de C con presencia de HQ 1 mM a diferentes velocidades de barrido: 20-50-100-200 mV/s.

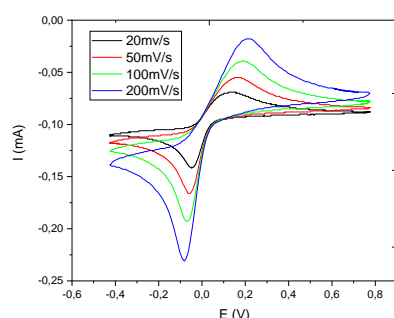


Figura 16: Voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido: 20-50-100-200 mV/s de la disolución de tampón Tris medido con electrodo serigrafiado de carbono en presencia de HQ 1 mM.

En la Figura 16 se puede apreciar que a medida que se aumenta la velocidad de barrido aumenta tanto la intensidad de los picos como la separación entre ellos, y se aprecia como la separación entre ellos es mayor a 163 mV, por ello se tratan de reacciones redox cuasirreversibles.

Como se tratan de reacciones cuasirreversibles para la determinación de la constante de transferencia heterogénea se determinará con el método de Nicholson. Por ello, lo primero es calcular el coeficiente de difusión mediante la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 13).

La Figura 17 muestra la representación de la intensidad corregida de pico de oxidación frente a la raíz de la velocidad de barrido para los voltamperogramas cíclicos realizados en este experimento.

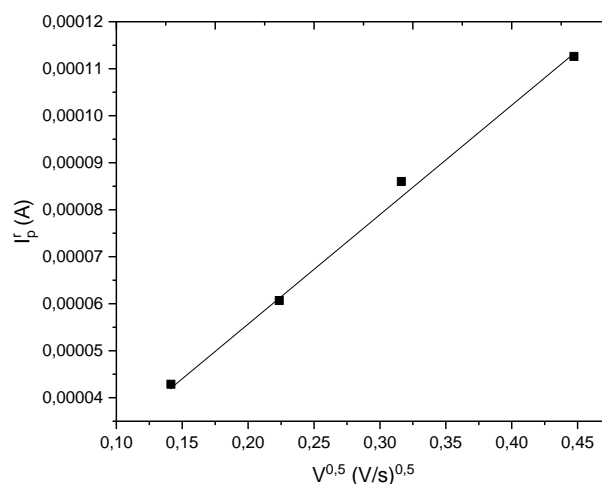


Figura 17: Representación de la intensidad corregida del pico de oxidación de la HQ frente a la raíz de la velocidad de barrido de la disolución de tampón Tris con presencia de HQ 1 mM empleando electrodo serigrafiado de carbono.

En la Figura 17 se puede apreciar cómo los picos de oxidación siguen la ecuación de Randles-Sevcik, ya que se obtiene una representación lineal de pendiente 2.31×10^{-4} ($A s^{0.5} V^{-0.5}$)

A partir de la pendiente se obtiene el coeficiente de difusión, cuyo valor es

$$D_{Tris} = 5.66 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/s$$

Como se puede observar, el valor es del orden a los obtenidos en medio ácido.

La Figura 18 muestra la representación de $1/\psi$ frente a la raíz de la velocidad de barrido para poder determinar la constante de transferencia heterogénea por el método de Nicholson. Los valores de ψ se obtuvieron con la ecuación 12, ya que la separación de picos es mayor a 162 mV, por ello se considera una especie redox con una irreversibilidad alta.

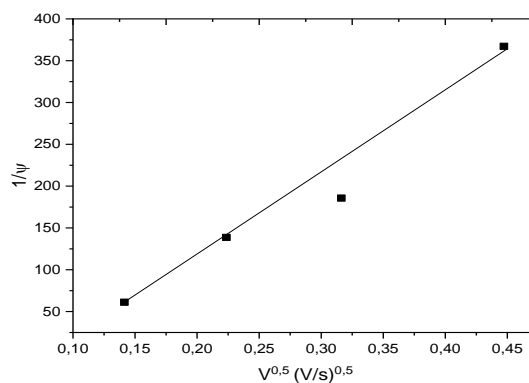


Figura 18: $1/\psi$ frente a la raíz de la velocidad de barrido. Ψ obtenido de la ecuación de Kingler-Kochi reformulada por Lavagnini a partir de los datos de los voltamperogramas de la disolución de tampón Tris con 1 mM de hidroquinona, medidos con electrodos serigrafiados de carbono.

En la Figura 18 se puede apreciar que la representación gráfica sigue una tendencia lineal cuya pendiente es $972.99 \text{ s}^{0.5} \text{ V}^{-0.5}$:

Despejando el valor de la pendiente con los parámetros de este experimento, y siguiendo la ecuación 5 se obtiene el valor de k^0 , que es:

$$k^0 = 3.25 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$$

3.2 Caracterización de monolitos de sílice.

3.2.1 Monolito convencional.

La Figura 19 muestra el voltamperograma estabilizado a 100 mV/s utilizando un electrodo serigrafiado de C en el monolito de sílice convencional.

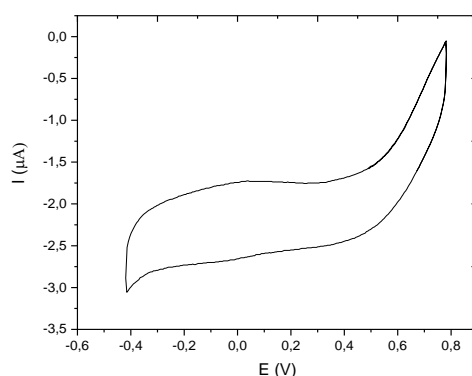


Figura 19: Voltamperograma del monolito de sílice convencional medido con electrodo serigrafiado de carbono.

En el voltamperograma de la Figura 19 se comienza el barrido de potencial a 0.00 V y toma un sentido positivo. No aparecen picos destacables hasta que a partir de 0.50 V aparece una corriente positiva relacionada con la reacción OER. Al llegar a 0.80 V se invierte el sentido de barrido, en este sentido solo se aprecian procesos de carga de la doble capa.

Hay que tener en cuenta que a diferencia que, en los casos anteriores, donde los ensayos eran en disolución y por ello al introducir la hidroquinona y homogenizar con una pipeta Pasteur se obtenía la respuesta del analito. Por eso, al realizar los experimentos

en monolitos de gel de sílice hay que esperar un tiempo a que el analito difunda y se aprecien

los picos de reducción y oxidación.

Por ello, en la Figura 20.A se muestran los voltamperogramas una vez que se haya añadido la HQ, y la concentración es de 1 mM en el monolito; y en la Figura 17.B se muestra la representación de la intensidad del pico de la hidroquinona frente al tiempo.

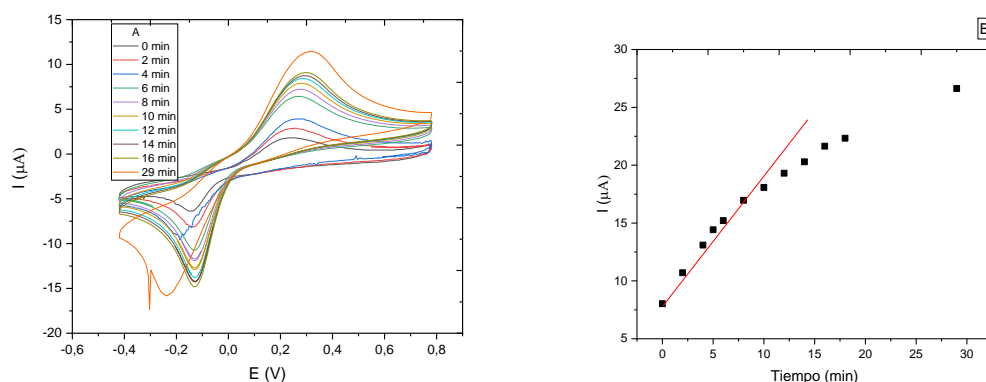


Figura 20: (A) Voltamperogramas cíclicos a 100 mV/s de los monolitos de sílice en presencia de HQ a lo largo del tiempo, medidos con electrodo serigráfico de carbono. (B) Representación de la intensidad de los picos de oxidación frente al tiempo.

En la Figura 20.A se aprecia que el barrido de potencial comienza a 0.00 V y se dirige hacia potenciales positivos, donde a 0.27 V se aprecia el pico de oxidación de la hidroquinona para dar benzoquinona, que a medida que pasa el tiempo aumenta la intensidad; en 0.80 V se invierte el sentido del barrido, y a -0.12 V se aprecia el pico de reducción de la benzoquinona, que le ocurre el mismo fenómeno con el tiempo que al pico de oxidación.

La Figura 20.B muestra la representación gráfica de la intensidad del pico de oxidación de la hidroquinona frente al tiempo, se aprecia que mantiene un comportamiento lineal durante unos 12 minutos, a partir de ahí comienza a curvarse, pero sigue aumentando la intensidad del pico de la HQ, de forma más lenta a medida que pasa el tiempo, haciendo que el aumento de la intensidad del pico con el tiempo sea cada vez menor, hasta que a 40 minutos ya se considera estable.

En la Figura 21 se muestran los voltamperogramas cíclicos del experimento del monolito sin modificar con hidroquinona presente a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s).

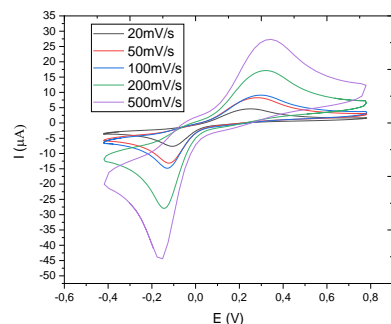


Figura 21: Voltamperogramas a las distintas velocidades de barrido de la prueba del monolito de gel de sílice convencional, con presencia de HQ 1 mM medido con electrodo serigrafiado de carbono.

Como se puede observar en la Figura 21, sigue la tendencia esperada de aumentar la intensidad de los picos correspondientes a la reacción redox de la HQ (7) a medida que la velocidad de barrido aumenta.

La Figura 22 muestra la representación de la intensidad corregida del pico de oxidación frente a la raíz de la velocidad de barrido para ver si se cumple la ecuación (13).

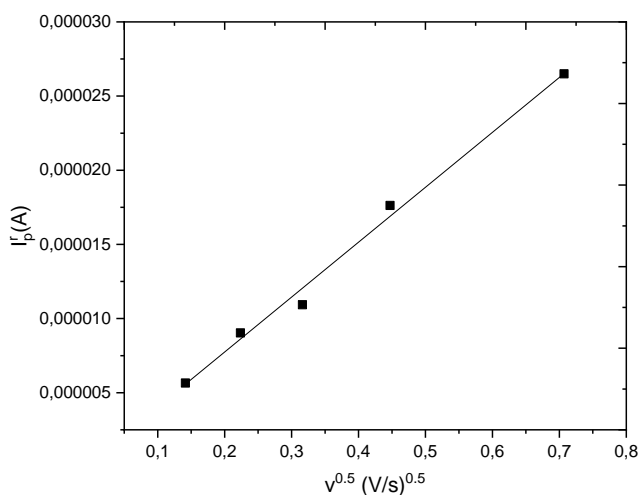


Figura 22: Representación de Randles-Sevcik del monolito de Sol-Gel sin modificar.

En la Figura 22 se puede apreciar que sigue una tendencia lineal, cuya pendiente es $3.72 \times 10^{-5} \text{ (A s}^{0.5} \text{ V}^{-0.5}\text{)}$.

Por ello, se puede afirmar que cumple la ecuación de Randles-Sevcik, y por ello se puede determinar el coeficiente de difusión a partir de su pendiente. Se realizaron un total

de 2 repeticiones para este experimento, y el resultado medio del coeficiente de difusión fue:

$$D_{\text{monolito convencional}} = 1.08 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Como se puede comprobar al comparar con los coeficientes de difusión en disolución, tanto en medio ácido como en tampón Tris, los monolitos de gel de sílice presentan una difusión más lenta, debido a que el analito debe pasar a través de la estructura de red hasta poder llegar a la zona del electrodo de trabajo.

3.2.2 Modificación de la estructura de gel de sílice modificada con metilos.

La Figura 21 muestra los voltamperogramas cíclicos de los monolitos de gel de sílice modificados en diferentes proporciones con $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{Me}$ (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%).

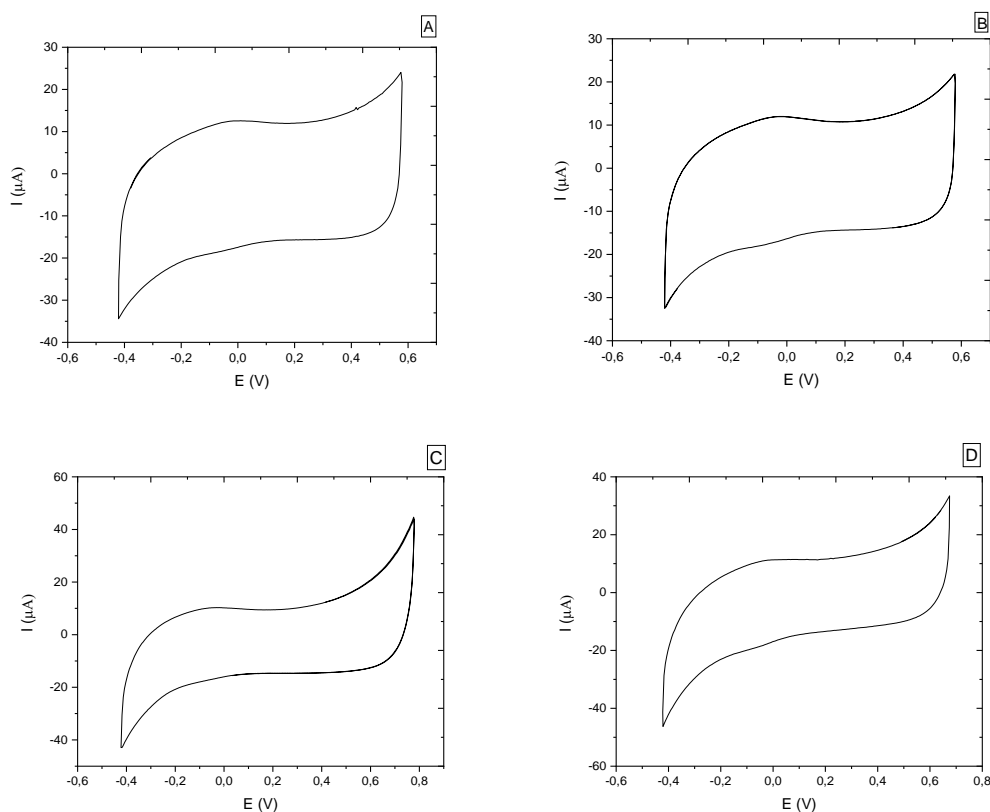


Figura 23: Voltamperogramas cíclicos del monolito de gel de sílice modificado con metilos, medido a 100 mV/s con electrodo serigrafado de carbono. (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%).

Como se puede apreciar en la Figura 20 en todos los diferentes experimentos probados la forma de los voltamperogramas es muy parecida entre ellos, empezando en todos los experimentos el barrido de potencial en 0.00 V, y dirigiéndose hacia potenciales positivos, llegando a 0.60 V, en el caso de las Figura 20.A y 20.B, y a 0.80 V en los otros dos casos se invierte el sentido del barrido de potencial, ahora dirigiéndose hacia potenciales negativos. Como se puede apreciar no aparece ningún pico destacable, sólo se aprecian procesos de carga de la doble capa.

En la Figura 24 se va a mostrar la evolución, de los voltamperogramas cíclicos de los experimentos realizados una vez que se añade hidroquinona en una concentración de 1 mM. (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%).

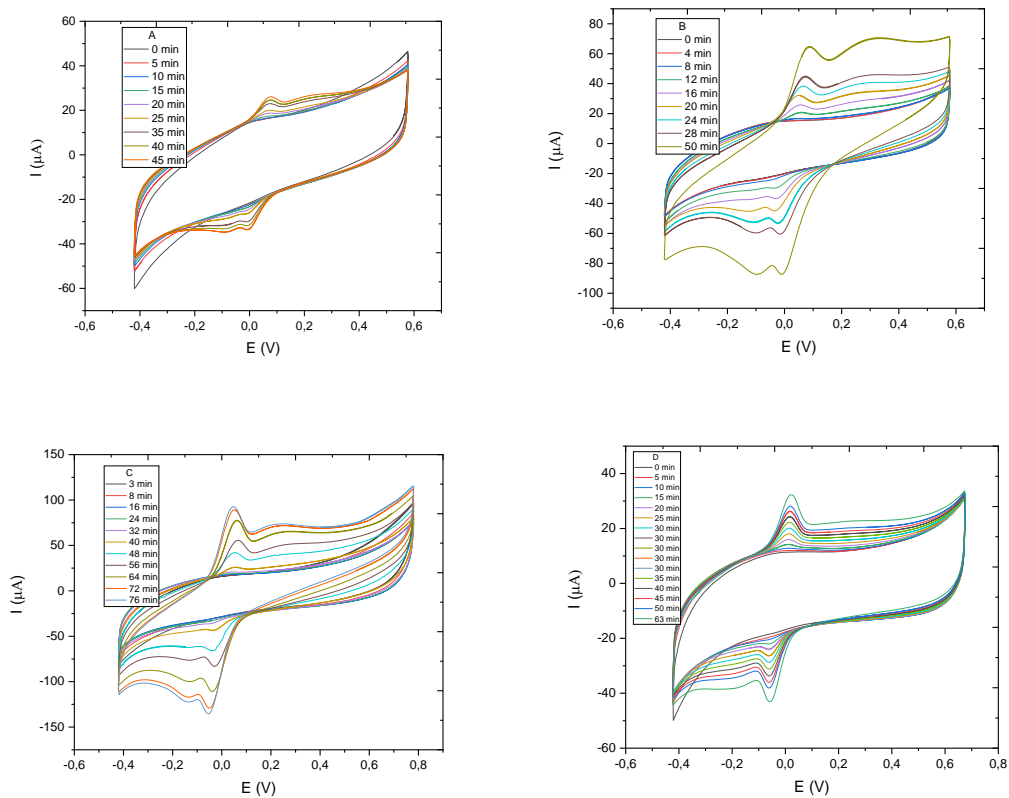


Figura 24: Voltamperogramas cíclicos de los monolitos de gel de sílice modificados con el modificador de metilo (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%). Medidos a 100 mV/s con un electrodo serigrafado de carbono con presencia de HQ de 1 mM.

En la Figura 24 se muestra la evolución de los voltamperogramas cíclicos de los distintos experimentos realizados de la modificación de gel de sílice con metilos que comienzan en 0.00 V, se dirigen hacia potenciales positivos y aparece el pico de oxidación de la HQ a un potencial de 0.00V, en 0.60 V se invierte el sentido del barrido de potencial

(0.80 V en el caso de la Figura 21.C), donde aparece el pico de reducción de la BQ a -0.05 V. En todos ellos se ve como aumentan las intensidades de las corrientes de los picos que relacionan la actividad electroquímica de la hidroquinona a medida que va transcurriendo el tiempo.

Como se puede observar la intensidad de los picos en la Figura 24 va en aumento hasta el 20%, por ello el 30% se descarta como buen candidato, además el monolito de 30 % que se preparó presentó turbidez, cosa que los otros no mostraron.

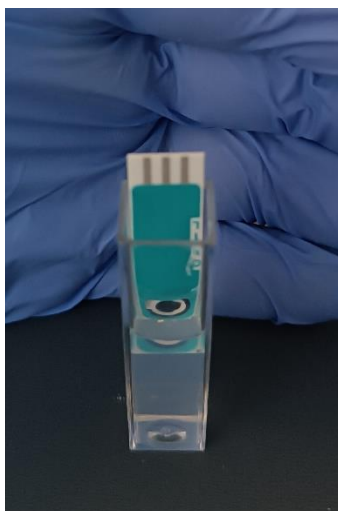
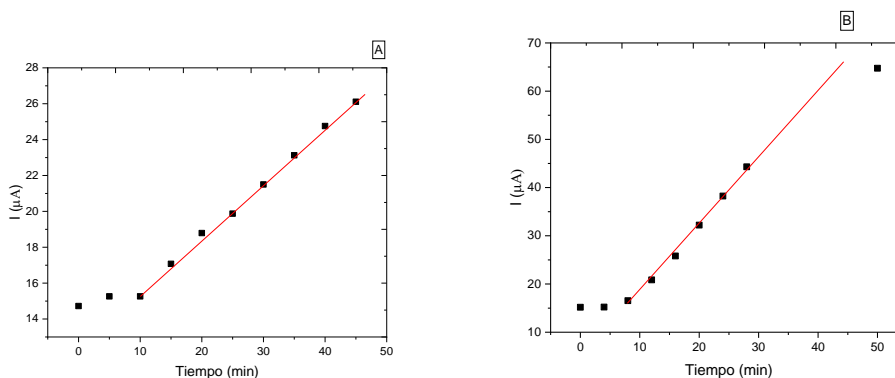


Figura 25: Imagen del monolito de 30% del modificador de red de metilo.

En la Figura 25 se aprecia como el monolito presentara turbidez, probablemente por el exceso de metilos.

La Figura 26 muestra las representaciones de la intensidad de los picos de oxidación de la HQ frente al tiempo, para poder ver la evolución que sigue en los monolitos de gel de sílice modificados con metilos. (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%).



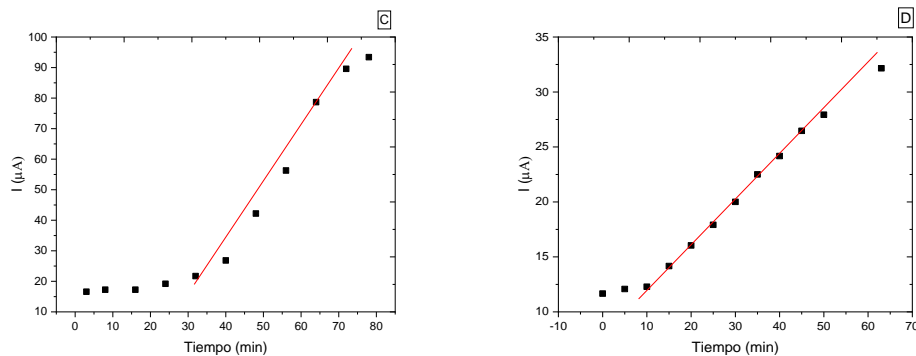
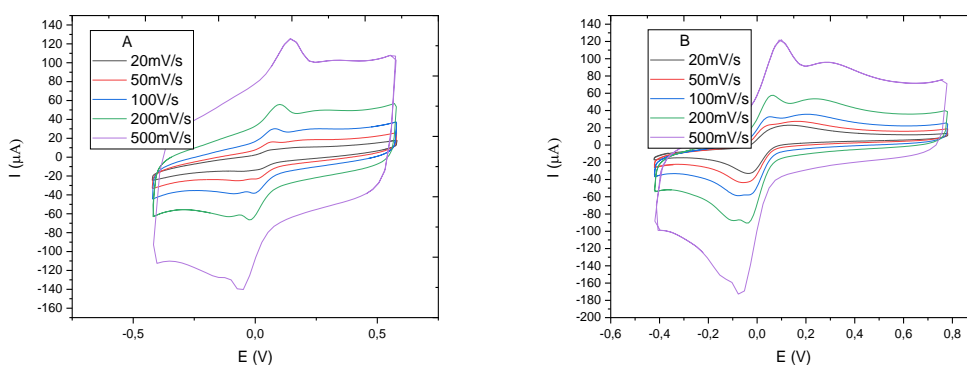


Figura 26: Representaciones de la intensidad de pico de oxidación de la HQ frente al tiempo en los distintos experimentos con modificador de red de metilo. (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%).

Como se puede apreciar, en la Figura 26, con cualquier modificador de red hay un tiempo que hay que esperar para empezar a detectar señal, que suele ser de 10 minutos, salvo en el caso del 20%, donde se tarda hasta 30 minutos. El aumento de intensidad de los picos de oxidación suele ser lineal en todos los casos hasta los 40 minutos, salvo el caso del 20%, donde ese comportamiento se llega a prolongar hasta los 65 minutos. Las medidas de la velocidad de barrido se realizaron una vez que los voltamperogramas eran estables.

En la Figura 24 se muestran los voltamperogramas cíclicos medidos a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s) para los experimentos de los monolitos de gel de sílice modificados con metilos (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30).



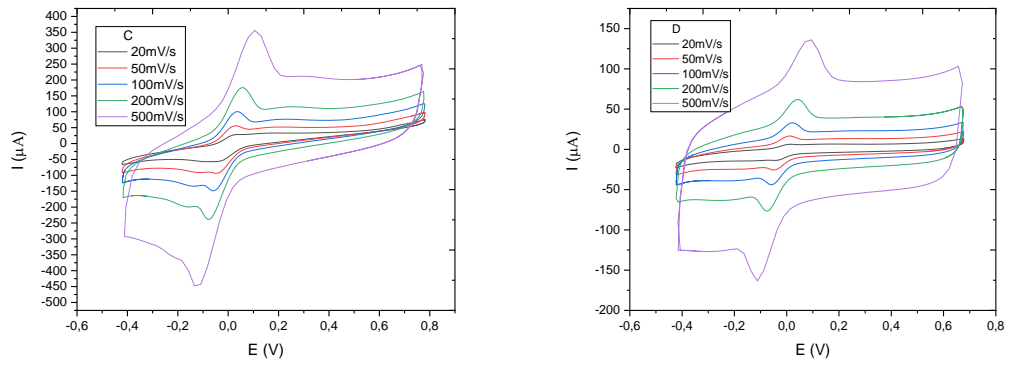


Figura 27: Voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s) de los monolitos de gel de sílice con diferentes porcentajes de $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{Me}$ (A:5%; B:10%; C: 20%; D: 30%), medidos con electrodo serigrafiado de carbono.

Como se puede apreciar en la Figura 27 todos los voltamperogramas de los modificadores de red siguen la tendencia esperada de ir aumentando la intensidad a medida que aumenta la velocidad de barrido.

La Figura 28 muestra la representación de la intensidad corregida de pico de oxidación frente a la raíz de la velocidad de barrido, para comprobar si los experimentos siguen una tendencia lineal.

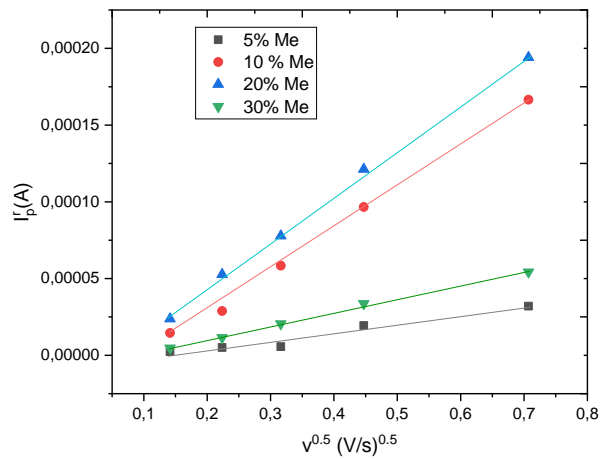


Figura 28: Representación de la intensidad corregida del pico de oxidación de la HQ frente a la raíz de la velocidad de barrido, para comprobar si sigue la tendencia de la ecuación de Randles-Sevcik (13) en los experimentos de los monolitos de gel de sílice con modificados con metilo, medidos con electrodo serigrafiado de carbono y con presencia de HQ 1 mM.

En la Figura 28 se puede observar cómo en todos los casos la ecuación (13) se sigue ya que las representaciones siguen una tendencia lineal, y a partir de ella se sacan los resultados de coeficientes de difusión de cada experimento.

La Tabla 7 muestra las diferentes pendientes para cada experimento diferente, con el coeficiente de difusión obtenido de cada uno de ellos.

Tabla 7: Pendientes de la Figura 28 y resultados de coeficientes de Difusión.

% de metilos	Pendientes ($A s^{0.5} V^{-0.5}$)	D (cm^2/s)
5	5.56×10^{-5}	2.71×10^{-7}
10	2.75×10^{-4}	3.49×10^{-6}
20	3.00×10^{-4}	6.31×10^{-6}
30	8.86×10^{-5}	$6,53 \times 10^{-7}$

Con los resultados de la Tabla 7 se puede concluir que todos los modificadores consiguen mejorar la difusión del analito, comparado con el coeficiente de difusión del monolito convencional, pero los únicos que lo consiguen de una forma significativa son los de 10 y 20%. Pero fijándonos en los datos de la Figura 26, se puede determinar que el mejor de los probados con metilos es el del 10 % debido a que es el que menos tarda en obtener una respuesta de los picos de las reacciones redox de la hidroquinona.

3.2.3 Modificación de la estructura de gel de sílice con fenilos.

La Figura 26 muestra los voltamperogramas de los dos ensayos medidos a 100 mV/s y con electrodo serigrafiado de carbono. En el caso A es utilizando un 5% de $Si(OEt)_3Phe$; mientras que en el caso B es con un 10%.

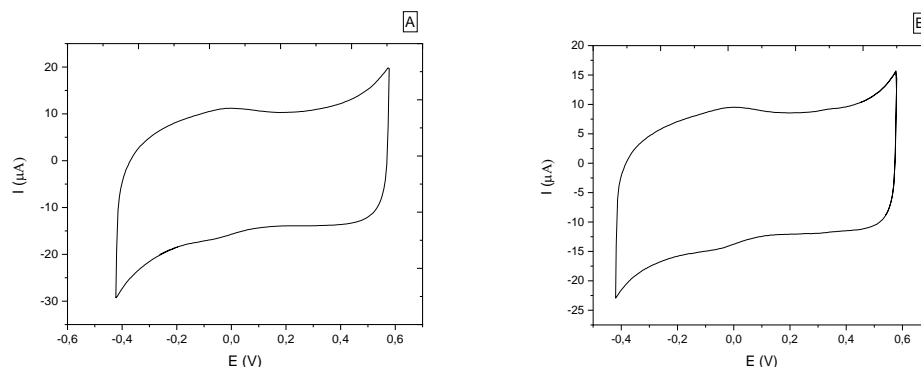


Figura 29: Voltamperogramas cíclicos de los monolitos de gel de sílice modificados con $Si(OEt)_3Phe$ en diferentes proporciones, medidos a 100 mV/s con electrodo serigrafiado de carbono. (A) 5%; (B) 10%.

En las Figuras 29.A y 29.B se comienza el barrido de potencial a 0.00 V, aumentando los valores de potencial hasta 0.60 V, y luego se invierte el sentido del barrido de potencial. En todo el barrido solo se aprecian los fenómenos de carga de la doble capa en ambas figuras.

Las Figuras 30.A y 30.B muestra la evolución de los voltamperogramas cíclicos de los experimentos de monolitos de gel de sílice modificados con fenilos (5 y 10% respectivamente) una vez que la concentración de HQ en el monolito es de 1 mM, a una velocidad de barrido de 100 mV/s con electrodo serigrafiado de carbono; mientras que las Figuras 30.C y 30.D se muestra la evolución del pico de la oxidación de la HQ frente al tiempo en los mismos experimentos (5 y 10 % de fenilo respectivamente).

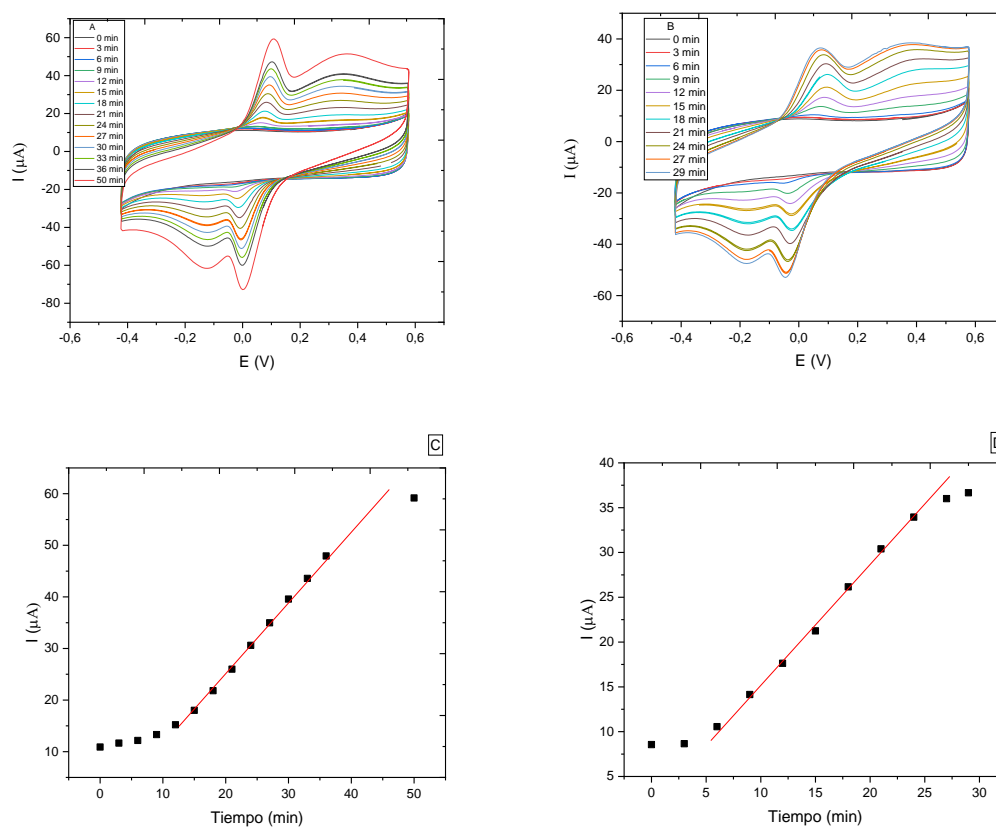


Figura 30: Evolución de los voltamperogramas cíclicos de los monolitos de gel de sílice a 100 mV/s medidos con electrodo serigrafiado de carbono modificados con $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{Phe}$ en diferentes proporciones (5% y 10%; A y B respectivamente) y con presencia de HQ 1 mM. 5% a la izquierda; 10% a la derecha. Representación de la intensidad de los picos de oxidación de la hidroquinona frente al tiempo para cada experimento. C es el 5 % y D es el 10 %.

En las Figuras 30.A y 30.B comienza el barrido de potencial a 0.00 V y se dirige hacia valores positivos, encontrando en 0.09 V un pico de oxidación, de corriente positiva, perteneciente a la oxidación de la HQ; en 0.60 V se invierte el sentido del barrido de potencial y aparece en -0.02 V un pico de intensidad negativa, que corresponde con la reducción de la BQ a HQ.

En las Figuras 30.C y 30.D se observa cómo durante los primeros instantes en el que se añade el sustrato no hay ninguna señal, pero cuando pasan 10 minutos y 6 minutos respectivamente comienza a percibir señal, siguiendo una tendencia lineal durante un tiempo. En el caso de la 30.C durante 40 minutos; y para el caso de la 30.D durante 25 minutos. Luego se empieza a curvar, dando un menor aumento de la intensidad con el tiempo. Para medir a diferentes velocidades de barrido se esperó hasta que se estabilizaran los voltamperogramas.

La Figura 31 muestra los voltamperogramas cíclicos de los dos experimentos realizados (A: 5% de fenilo; B: 10% de fenilo), a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s), en presencia de HQ 1 mM.

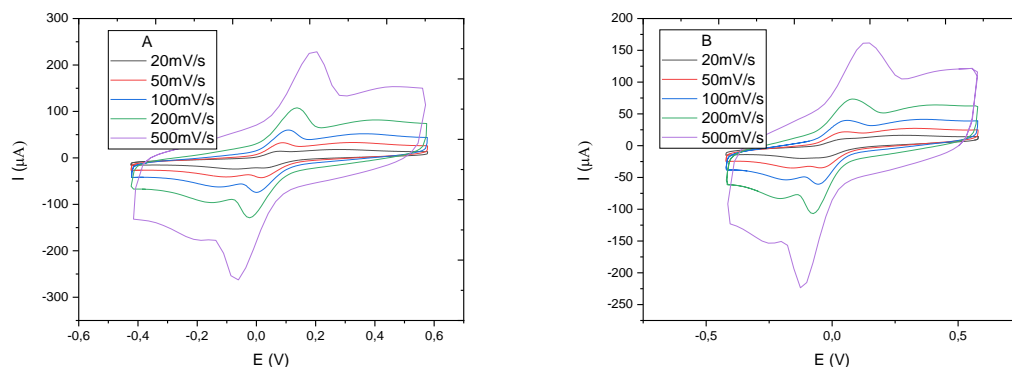


Figura 31: Voltamperogramas cíclicos de los monolitos de gel de sílice modificados con $\text{Si}(\text{OEt})_3\text{Phe}$ (A: 5%; B: 10%) a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s) en presencia de 1 mM de HQ, medidos con electrodo serigrafiado de C.

Se puede apreciar en la Figura 31 como ambos experimentos siguen la tendencia de aumentar la intensidad de los picos a medida que se aumenta la velocidad de barrido.

La Figura 32 muestra la representación de la intensidad corregida del pico de oxidación de HQ frente a la raíz de la velocidad de barrido para los dos experimentos para sacar el coeficiente de difusión mediante la ecuación de Randles-Sevcik (13).

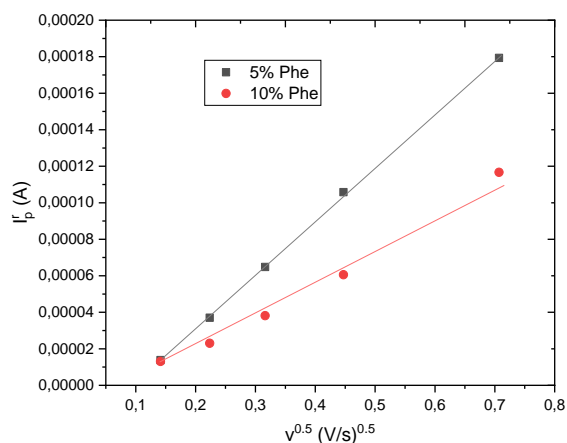


Figura 32: Representación de la intensidad corregida del pico de oxidación de la HQ frente a la raíz de la velocidad de barrido de los experimentos de modificación de la estructura del monolito de gel de sílice con fenilos, en presencia de HQ 1 mM, y medidos con electrodo serigrafiado de carbono.

En la Figura 32 se puede apreciar como sí que cumplen la ecuación de Randles-Sevcik, ya que las representaciones siguen tendencias lineales, y por ello, se puede calcular el coeficiente de difusión a partir de la pendiente de cada recta.

Las pendientes de cada recta fueron:

$$m_{5\%Phe} = 2.94 \times 10^{-4} (A s^{0.5} V^{-0.5})$$

$$m_{10\%Phe} = 1.85 \times 10^{-4} (A s^{0.5} V^{-0.5})$$

Los coeficientes de difusión obtenidos para cada caso son:

$$D_{5\%Phe} = 7.53 \times 10^{-6} cm^2/s$$

$$D_{10\%Phe} = 2.06 \times 10^{-6} cm^2/s$$

Como se puede observar, ambos coeficientes de difusión son mayores que el obtenido en el monolito convencional, pero entre los dos monolitos, el mejor es el del 10 % de fenilos, debido al menor tiempo necesario para obtener una respuesta estable del analito.

3.3. Caracterización del biosensor de ALP

3.3.1 Biosensor fabricado en sílice convencional.

En este caso se realizó la encapsulación de la fosfatasa alcalina dentro de la matriz de sílice convencional antes de añadir el sustrato.

En la Figura 33 se muestran los voltamperogramas estabilizados de la prueba del biosensor sin presencia de HQDP, y con presencia de HQDP.

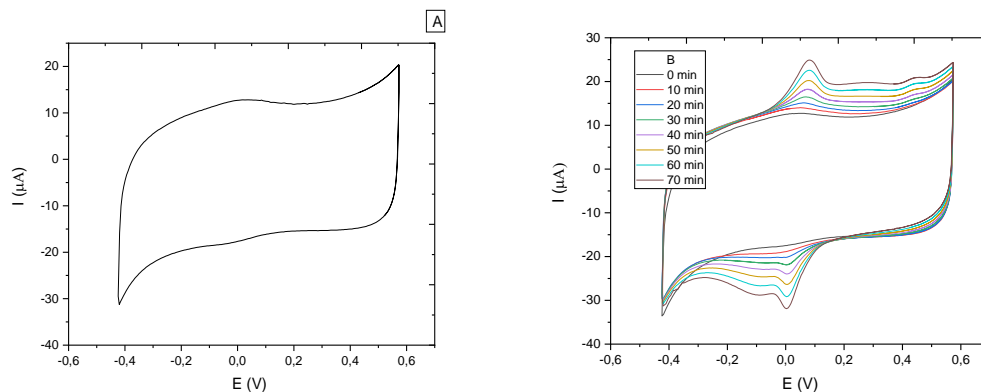


Figura 33 : Voltamperogramas estabilizados a 100 mV/s de los monolitos de Sol-Gel con ALP. (A) sin sustrato. (B) con la presencia de sustrato en concentración 1 mM.

La Figura 33.A muestra el voltamperograma de ALP en el que no se observan procesos redox de carácter faradáico, solo los procesos de carga de doble capa.

En la Figura 33.B se observa el voltamperograma estabilizado del monolito de gel de sílice con ALP, y la presencia del sustrato HQDP. En los voltagramas iniciales no aparecen procesos redox claros, solo la carga de la doble capa, ya que el sustrato HQDP no es electroactivo. A medida que transcurre el tiempo en barridos sucesivos se aprecia la aparición a 0.08 V de un pico de oxidación correspondiente a la reacción de oxidación de la hidroquinona, formada por la hidólisis del sustrato. A 0.00 V se aprecia el pico de reducción correspondiente. Además se puede observar la evolución de los picos a medida que pasa el tiempo.

La Figura 34 muestra la representación a la intensidad del pico de oxidación de la HQ formada en la reacción de HQDP frente al tiempo.

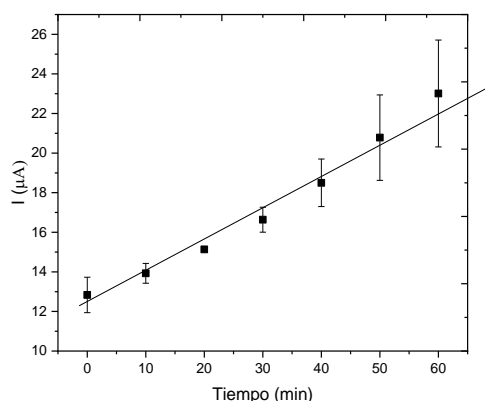


Figura 34: Representación de la intensidad del pico de oxidación de la HDQP frente al tiempo de la media de los 3 ensayos de la prueba del monolito de gel de sílice con ALP encapsulado.

Como muestra la Figura 34 la representación tiene forma lineal, cuya pendiente es: 0.1696 ($\mu\text{A}/\text{min}$). La pendiente de esta recta se puede relacionar con la velocidad de la reacción catalizada por la enzima ALP.

3.3.2 Biosensor fabricado en sílice modificada con grupos fenilos.

El único modificador que se probó fue el del 10% de fenilo, debido a que fue el mejor de los fenilos y porque a pesar de que el coeficiente de difusión del monolito con 10% de metilo tenga valores similares, tarda más en obtener una señal de los picos de la HQ, que la de ninguno de los modificadores obtenidos.

En la Figura 35 se van a mostrar los voltamperogramas estabilizados a 100 mV/s del experimento del monolito de gel de sílice modificado, primero sin el sustrato, y después con el sustrato cada diez minutos durante una hora.

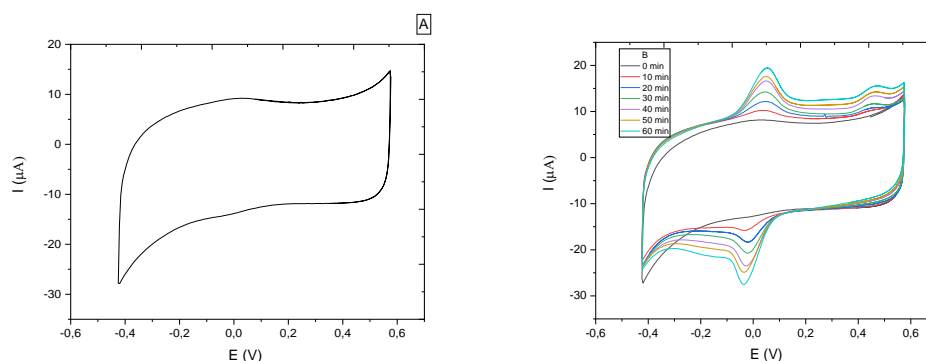


Figura 35: Voltamperogramas estabilizados a 100mV/s de los experimentos realizados en monolitos de Sol-Gel modificados con fenilos con ALP como encapsulado. (A) sin sustrato. (B) con sustrato en concentración de 1 mM.

En la Figura 35.A se muestra el voltamperograma cíclico de ALP en el que solo se observan procesos de carga de doble capa.

La figura 35.B muestra el voltamperograma del experimento del monolito del gel de sílice modificado con ALP, con la presencia de HQDP como sustrato. En los voltamperogramas iniciales no se aprecian procesos redox, pero a medida que transcurre el tiempo se comienzan a apreciar picos a 0.08 V. que corresponden a la oxidación de la HQ, signo de que se está hidrolizando la HQDP, también se aprecia a -0.01 V el pico de reducción de la. Además, se puede apreciar como con el paso del tiempo van aumentando la intensidad de los picos de la HQ.

La Figura 36 muestra la representación de la intensidad de pico de la oxidación de HQ frente al tiempo que se deja el experimento, se representa como promedio de los 3 ensayos realizados y con su desviación estándar.

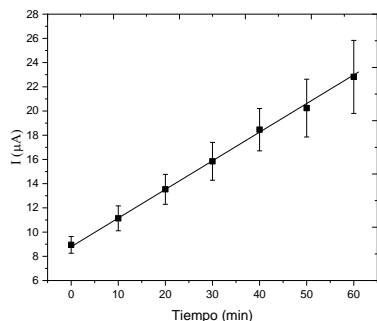


Figura 36: Representación de la intensidad de pico de oxidación de la HQDP frente al tiempo en los experimentos con modificador de red con ALP encapsulada, utilizando como electrodo serigrafiado de carbono.

La Figura 36 muestra que la representación sigue una tendencia lineal y que la desviación estándar aumenta conforme pasa el tiempo, al igual que ocurre en la Figura 31, en este caso la pendiente es 0.2312 ($\mu\text{A}/\text{min}$).

Por tanto, se observa que la hidrólisis de la HQDP es más rápida en el monolito modificado con fenilos ya que la pendiente de la recta es mayor que en el caso del monolito convencional. Por ello se concluye que modificar el monolito de gel de sílice con fenilos al 10% en volumen mejora la capacidad catalítica de la fosfatasa alcalina.

4. Conclusiones

1. La hidroquinona presenta actividad electroquímica y se puede cuantificar su concentración mediante voltamperometría cíclica.
2. El coeficiente de difusión de la hidroquinona en disolución acuosa se ha determinado a partir de medidas voltamétricas obteniéndose valores de 1.20×10^{-6} cm^2/s en medio ácido y de 5.66×10^{-6} cm^2/s a pH 8.2, empleando electrodos serigrafiados de carbono. Estos valores son diferentes que los de la bibliografía, pero su diferencia es justificable por las diferencias de condiciones empleadas.
3. Se han fabricado monolitos de gel de sílice mediante el método sol-gel y se ha caracterizado la respuesta electroquímica de la hidroquinona en estos hidrogeles de sílice se ha determinado el coeficiente de difusión de la HQ en sílice convencional, obteniéndose un valor de 1.08×10^{-7} cm^2/s , cual es menor al obtenido en disolución.
4. Se ha determinado que el coeficiente de difusión de la HQ en sílice se modifica con grupos metilos y fenilos. Se ha obtenido un valor de 2.06×10^{-6} cm^2/s para el caso del experimento modificado con 10% de fenilos, esto es 10 veces mayor que el coeficiente de difusión en el monolito convencional, y son valores cercanos a los del coeficiente de difusión en disolución.
5. Se ha encapsulado la enzima fosfatasa alcalina en monolitos de sílice para el desarrollo de un biosensor con transducción electroquímica empleando HQDP como sustrato de la enzima.
6. Se ha determinado la cinética de la hidrólisis de la enzima en la sílice convencional y en la sílice modificada con grupos fenilos, obteniendo una mejor cinética en el caso de la sílice modificada con grupos fenilos, probablemente por un mejor acceso del sustrato en la sílice modificada.

5. Bibliografía

- (1) Pastorino, P.; Ginebreda, A. Contaminants of Emerging Concern (CECs): Occurrence and Fate in Aquatic Ecosystems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021, p 13401. <https://doi.org/10.3390/ijerph182413401>.
- (2) Carpenter, A.; Kostianoy, A. G. Introduction to Part I: The International Context. In *Handbook of Environmental Chemistry*; Springer Verlag, 2018; Vol. 83, pp 1–7. https://doi.org/10.1007/698_2018_368.
- (3) Adolph, M.-L.; Dressler, M.; Troelstra, V.; Wrozyna, C.; Haberzettl, T. Eutrophication and Contamination Dynamics of Schweriner See, NE-Germany, during the Past 670 Years – A Multi-Proxy Approach on Lacustrine Surface Sediments and Sediment Cores. *Sci. Total Environ.* **2023**, 162745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162745>.
- (4) García Navia, A. ¿Qué está pasando en el Mar Menor? La eutrofización y sus efectos <https://theobjective.com/sociedad/medioambiente/2022-04-27/mar-menor-eutrofizacion/> (accessed Jun 4, 2023).
- (5) Irfan Azizan, M. A.; Taufik, S.; Norizan, M. N.; Abdul Rashid, J. I. A Review on Surface Modification in the Development of Electrochemical Biosensor for Malathion. *Biosensors and Bioelectronics: X*. Elsevier Ltd May 1, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100291>.
- (6) Nagel, B.; Dellweg, H.; Gierasch, L. M. Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology. *Pure Appl. Chem.* **1992**, 64 (1), 143–168. <https://doi.org/10.1351/pac199264010143>.
- (7) Mendoza-Madrigal, A. G.; Chanona-Pérez, J. J.; Hernández-Sánchez, H.; Palacios-González, E.; Calderón-Domínguez, G.; Méndez-Méndez, J. V.; Blasco, J.; Villa-Vargas, L. A. Biosensores Mecánicos En El Área Biológica y Alimentaria: Una Revisión. *Rev. Mex. Ing. química* **2013**, 12 (2), 205–225.
- (8) La Facultad De Química Farmacéutica, R. DE; Jiménez, C. C.; León P, D. E. Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas En El Control y Calidad de Procesos y Productos Alimenticios Biosensors: Implementation and Outlook in the Control and pro-cess Quality and Foodstuffs. *Rev. LA Fac. QUÍMICA Farm.* **2009**, 16 (1), 144–154.
- (9) International Union of Biochemistry and Molecular Biology. IUBMB Nomenclature Home Page <https://iubmb.qmul.ac.uk/> (accessed May 22, 2023).
- (10) Walker, N. L.; Roshkolaeva, A. B.; Chapoval, A. I.; Dick, J. E. Recent Advances

- in Potentiometric Biosensing. *Curr. Opin. Electrochem.* **2021**, *28*.
<https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2021.100735>.
- (11) Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. Potentiometric Ion Sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 329–351.
<https://doi.org/10.1021/CR068100W/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR068100WE00025.GIF>.
- (12) Ding, J.; Yu, N.; Wang, X.; Qin, W. Sequential and Selective Detection of Two Molecules with a Single Solid-Contact Chronopotentiometric Ion-Selective Electrode. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (3), 1734–1739.
https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B03522/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-03522Z_0005.JPEG.
- (13) Soldatkina, O. V.; Kucherenko, I. S.; Soldatkin, O. O.; Pyeshkova, V. M.; Dudchenko, O. Y.; Kurç, B. Akata; Dzyadevych, S. V. Development of Electrochemical Biosensors with Various Types of Zeolites. *Appl. Nanosci.* **2019**, *9*, 737–747.
<https://doi.org/10.1007/s13204-018-0725-9>.
- (14) Novell, M.; Parrilla, M.; Crespo, G. A.; Rius, F. X.; Andrade, F. J. Paper-Based Ion-Selective Potentiometric Sensors. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4695–4702.
https://doi.org/10.1021/AC202979J/SUPPL_FILE/AC202979J_SI_001.PDF.
- (15) Bialas, F.; Reichinger, D.; Becker, C. F. W. Biomimetic and Biopolymer-Based Enzyme Encapsulation. *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc. October 1, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109864>.
- (16) Minassian-Saraga, L. Ter. Thin Films Including Layers: Terminology in Relation to Their Preparation and Characterization (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66* (8), 1667–1738. <https://doi.org/10.1351/pac199466081667>.
- (17) Suni, I. I. Substrate Materials for Biomolecular Immobilization within Electrochemical Biosensors. *Biosensors*. 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11070239>.
- (18) Alemán, J.; Chadwick, A. V.; He, J.; Hess, M.; Horie, K.; Jones, R. G.; Kratochvíl, P.; Meisel, I.; Mita, I.; Moad, G.; Penczek, S.; Stepto, R. F. T. Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Sols, Gels, Networks, and Inorganic-Organic Hybrid Materials (IUPAC Recommendations 2007). *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79* (10), 1801–1829. <https://doi.org/10.1351/pac200779101801>.
- (19) Kono, H.; Otaka, F.; Ozaki, M. Preparation and Characterization of Guar Gum Hydrogels as Carrier Materials for Controlled Protein Drug Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 830–840. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.050>.

- (20) Wijayanti, S. D.; Rahayu, F. S.; Widyaningsih, T. D. Optimization of Sol-Gel Medium for Entrapment of Acetylcholinesterase Enzyme in Biosensor for Pesticide Detection. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *131* (1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/131/1/012045>.
- (21) García Martínez, C. Desarrollo de Un Biosensor de Inhibición Enzimática de Fosfatasa Alcalina Para La Detección de Eventos de Eutrofización. *Trab. fin grado Univ. Alicant.* **2022**.
- (22) Bárcena Ruiz, J. A.; García Alfonso, C.; Padilla Peña, C. A.; Martínez Galisteo, E.; Díez Dapena, J. Caracterización Cinética de La Fosfatasa Alcalina. *Dep. Bioquímica y Biol. Mol.* **2013**, *30*, 1–13.
- (23) Productos: Difosfato hidroquinona | Metrohm https://www.metrohm.com/es_es/products/hqd/hqdp.html (accessed May 23, 2023).
- (24) Jordá García, C. Desarrollo de Un Biosensor Electroquímico de Fosfato Para El Medio Marino. Trabajo Fin de Grado. Ciencias Del Mar., 2019.
- (25) KESTER, D. R.; DUEDALL, I. W.; CONNORS, D. N.; PYTKOWICZ, R. M. PREPARATION OF ARTIFICIAL SEAWATER¹. *Limnol. Oceanogr.* **1967**, *12* (1), 176–179. <https://doi.org/10.4319/LO.1967.12.1.0176>.
- (26) Cho, S. -B; Nakanishi, K.; Kokubo, T.; Soga, N.; Ohtsuki, C.; Nakamura, T.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Dependence of Apatite Formation on Silica Gel on Its Structure: Effect of Heat Treatment. *J. Am. Ceram. Soc.* **1995**, *78* (7), 1769–1774. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1995.tb08887.x>.
- (27) López, S. Transferencia Electrónica Directa a Citocromo c Inmovilizado Sobre Electrodo Modificados. Aplicación En Sensores Amperométricos. *Tesis Dr. Univ. Alicant.* **2017**, 275.
- (28) Pingarrón Carrazón, J. M.; Sánchez Batanero, P. *Química Electroanalítica : Fundamentos y Aplicaciones*, Primera.; Editorial Síntesis, 1999.
- (29) Wu, J.; Yuan, X. Z.; Wang, H. Cyclic Voltammetry. In *PEM Fuel Cell Diagnostic Tools*; 2011; pp 71–85. <https://doi.org/10.1201/9781439807842.ch10>.
- (30) Biesheuvel, P. M.; Porada, S.; Dykstra, J. E. The Difference between Faradaic and Non-Faradaic Electrode Processes. *arxiv* **2018**.
- (31) Cynthia G. Zoski. *Handbook of Electrochemistry*, First.; 2007.
- (32) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Wiley, J. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (1), A25. <https://doi.org/10.1021/ED060PA25.1>.

- (33) Nicholson, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal. Chem.* **1965**, *37* (11), 1351–1355. https://doi.org/10.1021/AC60230A016/ASSET/AC60230A016.FP.PNG_V03.
- (34) Klingler, R. J.; Kochi, J. K. Electron-Transfer Kinetics from Cyclic Voltammetry. Quantitative Description of Electrochemical Reversibility. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85* (12), 1731–1741. <https://doi.org/10.1021/j150612a028>.
- (35) Lavagnini, I.; Antiochia, R.; Magno, F. An Extended Method for the Practical Evaluation of the Standard Rate Constant from Cyclic Voltammetric Data. *Electroanalysis* **2004**, *16* (6), 505–506. <https://doi.org/10.1002/elan.200302851>.
- (36) Thorogood, C. A.; Wildgoose, G. G.; Crossley, A.; Jacobs, R. M. J.; Jones, J. H.; Compton, R. G. Differentiating between Ortho- and Para-Quinone Surface Groups on Graphite, Glassy Carbon, and Carbon Nanotubes Using Organic and Inorganic Voltammetric and X-Ray Photoelectron Spectroscopy Labels. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (20), 4964–4974. https://doi.org/10.1021/CM071412A/SUPPL_FILE/CM071412A-FILE002.PDF.
- (37) Zoski, C. G. *Handbook of Electrochemistry*; Elsevier, 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51958-0.X5000-9>.
- (38) Sramkova, E.; Bystron, T.; Bouzek, K. Quantification of Electrocatalytic Activity of Glassy Carbon Electrode. *Electrochim. Acta* **2021**, 379. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2021.138177>.

6. Anexo

En el anexo se van a mostrar todos los resultados obtenidos del experimento de caracterización de la hidroquinona en medio ácido (H_2SO_4 0.5 M) con el electrodo serigrafiado de carbono, ya que las condiciones experimentales fueron diferentes a las utilizadas en el caso del electrodo de platino.

En el experimento realizado con el electrodo serigrafiado de carbono el electrodo de referencia que se utilizó fue el propio que lleva de Ag, y la concentración de hidroquinona con la que se realizaron las medidas fue de 6×10^{-4} M.

La Figura 37 muestra el voltamperograma cíclico a 100 mV/s del experimento medido con electrodo serigrafiado de carbono y con la presencia de HQ en una concentración de 0.6 mM.

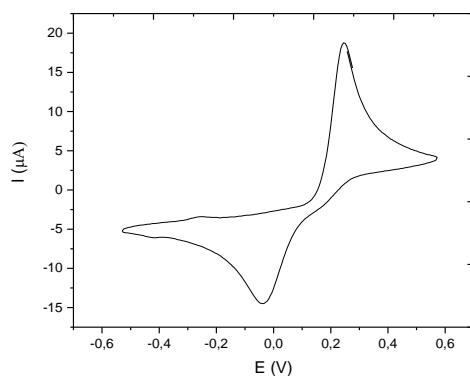


Figura 37: Voltamperograma cíclico, a 100mV/s del experimento de caracterización de la hidroquinona en medio ácido (H_2SO_4 0.5 M) con electrodo serigrafiado de carbono, y con la presencia de HQ en concentración de 6×10^{-4} M.

En la Figura 37 se aprecia el voltamperograma cíclico para el electrodo serigrafiado de carbono. Su potencial inicial es 0.00 V, y se sigue un barrido de potencial en sentido positivo, a 0,25 V se aprecia un pico de corriente de oxidación, el de la HQ para dar benzoquinona. Cuando se alcanza una corriente de 0.60 V se invierte el sentido del barrido de potencial, tomando un sentido negativo, a -0.04 V se aprecia un pico de reducción, en este caso de la benzoquinona. El barrido de potencial se realiza hasta -0.53 V.

La Figura 38 muestra los distintos voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s) del experimento en medio ácido con electrodo serigrafiado de carbono como electrodo de trabajo y electrodo de Ag como referencia.

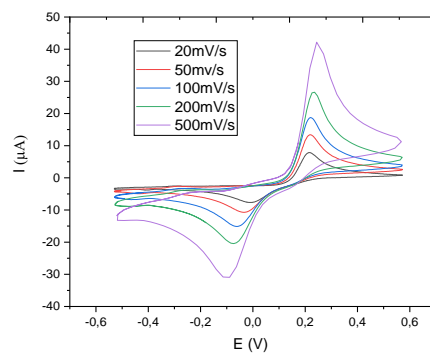


Figura 38: Voltamperogramas del experimento en medio ácido con electrodo serigrafiado de carbono a diferentes velocidades de barrido (20-50-100-200-500 mV/s).

En la Figura 38 se puede observar cómo a medida que se aumenta la velocidad a la que se realiza el barrido del potencial aumenta la intensidad de los dos picos correspondientes a la actividad redox de la hidroquinona y su distancia entre picos.