



---

Universidad Autónoma de Barcelona  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química

**Desarrollo de biosensores enzimáticos  
miniaturizados para su aplicación en la  
industria alimentaria.**

Javier Gonzalo Ruiz

Tesis Doctoral

Barcelona, 2006

Centro Nacional de Microelectrónica, IMB  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Fco. Javier Muñoz Pascual, Científico Titular del CSIC, y M<sup>a</sup> Asunción Alonso Lomillo, contratada I3P en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona,

INFORMAN,

Que la presente memoria, titulada "*Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria*", ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microsistemas por **Javier Gonzalo Ruiz**, y autorizan su presentación para que sea defendida como Tesis Doctoral.

Barcelona, 14 de Julio de 2006.

Fdo.: Fco. Javier Muñoz Pascual

Fdo.: M<sup>a</sup> Asunción Alonso Lomillo



---

Universidad Autónoma de Barcelona  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química

**Josep Peral Pérez**, Profesor Titular de Química Física en el Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, se declara conforme con la presentación de la tesis,

*“Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria”*

presentada por Javier Gonzalo Ruiz para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Barcelona, 14 de Julio de 2006.

Fdo.: Josep Peral Pérez

*A mis padres  
Y mis hermanos*

## Agradecimientos

Bueno, por fin llegó el momento más esperado de todas las tesis, el que indica que ya acabó el suplicio que supone escribir una memoria, los agradecimientos.

Primero, quiero agradecer a mis dos directores de tesis, Dr. Francesc Xavier Muñoz y M<sup>a</sup> Asunción Alonso.

A PacoXavi, gracias por confiar en mi para realizar este trabajo y sobretodo por seguir manteniendo esa confianza a pesar de las épocas en las que no he rendido al 100%. Por su guía, sobretodo en la parte tecnológica más de esta tesis. Y por ser más que un director de tesis, ser un compañero más de trabajo con el que puedes pasar buenos ratos.

A Asun, esta tesis no habría acabado así si no hubieras llegado al CNM. Gracias por tu aportación en la parte analítica y el tratamiento de enzimas. Gracias por cumplir tu palabra y seguir ayudándome a pesar de estar en Madrid. Gracias por no ponernos de acuerdo ni en el tamaño de las figuras, ah no, por esto no te doy las gracias, esto ya lo discutiremos cuando nos veamos... En serio, muchas gracias por todo, es una lástima que Burgos este tan lejos de Barcelona.

A mis compañeros de grupo, Olga, Xavi, Roger, Neus, Olivier, Javier, Roser y Eva. Gracias por la ayuda que me habéis prestado cuando la he necesitado, y por la paciencia de aquellos que han compartido laboratorio conmigo, cada vez que trabajaba en uno de ellos era como si hubiera pasado un huracán. Gracias también al los que forman el departamento de  $\mu$ sisistemas, especialmente a Marta Duch, por su ayuda con la fabricación de electrodos de referencia, y a Enric Cabruja, por su colaboración en la parte de fabricación de electrodos serigráficos.

Como no, gracias a aquellos que comparten el café de la mañana y/o despacho conmigo, Gemma, Hector, Andreu, Víctor, Roberto, Jesús, Miguel, Montse y los que seguro me olvido. No me puedo olvidar de Lia, la de cantidad de cosas que nos han pasado! espero que sigamos con el buen rollo de ahora durante mucho tiempo, y ánimo que a ti también te queda poco para acabar con esto del doctorado.

Hay un par de personas en el CNM que les debo muchos buenos momentos de estos últimos años, dentro y fuera del trabajo. Mariajo, siempre dispuesta a escucharme y ayudarme en lo que sea, se te echa de menos ahora que estas en los USA. Me hubieran venido bien esos momentos de relax en estas últimas semanas de escritura. La otra persona es Irene, bufff son muchas las cosas que me vienen a la cabeza ahora mismo (supongo que la mayoría te las puedes imaginar...) no se, simplemente mil gracias por estar mi lado. Que esas tardes de "nos tomamos una?" y nos acaban dando las tantas de la madrugada no las perdamos nunca.

Por supuesto, gracias a Alfredo. Compañero de trabajo, de equipo de basket, de barra de bar y de muchos otros momentos. Muchas gracias por tu ayuda, en los momento buenos y en los malos, ya he perdido la cuenta de las veces que me has demostrado que puedo contar contigo para lo que sea. Y gracias a Fanny, aunque creo que ella también me las tiene que dar a mi por aguantar al pesado de su marido más horas que ella a lo largo de la semana...

A mis amigos, los que he ido haciendo durante estos años y, por suerte, aún mantengo. A Alex (gracias por aguantar así de bien mi "buen" humor estos últimos meses de convivencia), Diego, Lidia y Noly (los abdul). A Tony y cristina, de la época del instituto. A Olga, a pesar de llevar mucho tiempo lejos sigues siendo una buena amiga, Laura y Belén, de la uni. A Quico (y Sonia), Víctor, Iván, Germán y el resto del equipo de basket. A Felix, Cigui, Isaac, Sara, Raúl, Bea, Piluca, a la peña los trapalas (+ Sara) con los que tan buenos ratos he pasado en Berlanga de Duero. De estos buenos ratos en el pueblo (y no solo en

el pueblo) tiene gran parte de culpa mi primita Marta, pensar que hace años nos ignorábamos mutuamente y ahora somos casi inseparables! Y a Ana, de las últimas personas que ha entrado a formar parte de mi vida pero posiblemente la que más ha aguantado en estos últimos meses, gracias por tu paciencia y por seguir aguantándome.

Hay dos amigos a los que les debo no solo les debo muchos buenos momentos, también ayuda en los momentos malos, tanto para escucharme como para distraerme y ayudarme a olvidar ciertas cosas cuando ha sido necesario. Son como de la familia (de hecho mi madre dice que ha criado a uno de ellos...) Jose, Ferran: muchísimas gracias.

A mi familia. A mis tíos y primos a los "morrodos" de mis abuelos. Y, por sobretodo, a mis padres, Avelino y Juanita, y a mis hermanos, Carmina y Jordi. Haga lo que haga se que siempre los tendré a mi lado, solo puedo deciros que os quiero.

Bueno, si estas leyendo esto es muy posible que merezcas estar en estas páginas. Si no estás, no me lo tengas en cuenta, ya me conoces y sabes que el despiste es una de mis "virtudes", así que GRACIAS.

**Capítulo I: Introducción.**

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| <b>I.- INTRODUCCIÓN</b> | <b>3</b> |
|-------------------------|----------|

**PRIMERA PARTE: Aspectos generales.****Capítulo II: Fundamentos teóricos y antecedentes bibliográficos.**

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>II.1.- SENSORES QUÍMICOS Y BIOSENSORES.</b> | <b>12</b> |
| II.1.1.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN.           | 13        |
| II.1.2.- TRANSDUCTORES ELECTROQUÍMICOS         | 15        |
| II.1.3.- RECEPTORES BIOLÓGICOS.                | 20        |
| II.1.4.- MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN.            | 26        |
| II.1.5.- BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO.   | 32        |
| II.1.6.- BIOSENSORES MINIATURIZADOS.           | 36        |
| <b>II.2.- APLICACIONES INDUSTRIALES.</b>       | <b>38</b> |
| <b>II.- BIBLIOGRAFÍA.</b>                      | <b>43</b> |

**SEGUNDA PARTE: Tecnología de fabricación.****Capítulo III: Microelectrónica de silicio. Fabricación de microchips.**

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>III.- OBJETIVOS.</b>                                  | <b>57</b> |
| <b>III.1.- INTRODUCCIÓN.</b>                             | <b>59</b> |
| <b>III.2.- TÉCNICAS DE FABRICACIÓN MICROELECTRÓNICA.</b> | <b>61</b> |
| III.2.1.- TÉCNICAS DE DEPOSICIÓN Y CRECIMIENTO.          | 61        |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.2.1.1.- Crecimiento térmico.                                          | 62        |
| III.2.1.2.- Procesos de deposición de materiales.                         | 63        |
| III.2.1.2.1.- Deposición física en fase gas (PVD).                        | 64        |
| III.2.1.2.2.- Deposición química en fase gas (CVD)                        | 66        |
| III.2.2.- FOTOLITOGRAFÍA.                                                 | 68        |
| III.2.3.- GRABADO.                                                        | 70        |
| III.2.3.1.- Grabado húmedo.                                               | 71        |
| III.2.3.2.- Grabado seco.                                                 | 72        |
| III.2.3.3.- Grabado indirecto o “Lift-off”                                | 73        |
| <b>III.3.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.</b>                             | <b>74</b> |
| <b>III.4.- DISEÑO Y FABRICACIÓN DE LOS <math>\mu</math>TRANSDUCTORES.</b> | <b>75</b> |
| III.4.1.- DISEÑO DE LOS $\mu$ TRANSDUCTORES.                              | 75        |
| III.4.2.- FABRICACIÓN DE LOS $\mu$ TRANSDUCTORES.                         | 78        |
| <b>III.5.- CARACTERIZACIÓN DE LOS <math>\mu</math>TRANSDUCTORES.</b>      | <b>82</b> |
| <b>III.- BIBLIOGRAFÍA.</b>                                                | <b>89</b> |

## Capítulo IV: Tecnología de fabricación de electrodos serigráficos.

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| <b>IV.- OBJETIVOS.</b>                                  | <b>95</b>  |
| <b>IV.1.-INTRODUCCIÓN.</b>                              | <b>97</b>  |
| IV.1.1.- PANTALLAS.                                     | 98         |
| IV.1.2.- SUSTRATOS.                                     | 100        |
| IV.1.3.- PASTAS Y TINTAS.                               | 101        |
| <b>IV.2.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.</b>            | <b>102</b> |
| <b>IV.3.- DISEÑO Y FABRICACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS.</b> | <b>103</b> |
| IV.3.1.- DISEÑO DE LOS DISPOSITIVOS.                    | 103        |
| IV.3.2.- FABRICACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS.               | 105        |
| <b>IV.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS.</b>      | <b>108</b> |
| IV.4.1.- PERFILOMETRÍA.                                 | 109        |
| IV.4.2.- CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA.                | 111        |
| <b>IV.- BIBLIOGRAFÍA.</b>                               | <b>117</b> |

## Capítulo V: Integración del electrodo de referencia.

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>V.- OBJETIVOS.</b>                                              | <b>121</b> |
| <b>V.1.- INTRODUCCIÓN.</b>                                         | <b>123</b> |
| <b>V.2.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.</b>                        | <b>127</b> |
| <b>V.3.- FABRICACIÓN DE LOS ELECTRODOS.</b>                        | <b>128</b> |
| V.3.1.- PSEUDO-REFERENCIAS BASADOS EN AG/ AGCL.                    | 128        |
| V.3.1.1. - Combinación de tecnología " <i>thin y thick film</i> ". | 130        |
| V.3.1.2.- Pseudo-referencias fabricados electroquímicamente.       | 134        |
| V.3.2.- PSEUDO-REFERENCIAS BASADOS EN ÓXIDOS METÁLICOS.            | 134        |
| V.3.2.1.- Pseudo-referencias basados en óxido de iridio.           | 136        |
| V.3.2.2.- Pseudo-referencias basados en óxido de plata.            | 139        |
| <b>V.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS.</b>                    | <b>139</b> |
| V.4.1.- PSEUDO-REFERENCIAS BASADOS EN AG/ AGCL.                    | 139        |
| V.4.1.1.- Combinación de tecnologías <i>thin y thick film</i> .    | 139        |
| V.4.1.2.- Pseudo-referencias fabricados electroquímicamente.       | 143        |
| V.4.2.- PSEUDO-REFERENCIAS BASADOS EN ÓXIDOS METÁLICOS.            | 150        |
| V.4.2.1.- Pseudo-referencias basados en óxido de iridio.           | 150        |
| V.4.2.2.- Pseudo-referencias basados en óxido de plata.            | 154        |
| <b>V.- BIBLIOGRAFÍA.</b>                                           | <b>159</b> |

## TERCERA PARTE: Aplicaciones analíticas.

### Capítulo VI: Determinación de glucosa utilizando microchips amperométricos.

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| <b>VI.- OBJETIVOS.</b>      | <b>165</b> |
| <b>VI.1.- INTRODUCCIÓN.</b> | <b>167</b> |
| <b>VI.2.- EXPERIMENTAL</b>  | <b>171</b> |

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| VI.2.1.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.                            | 171        |
| VI.2.2.- MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO.                    | 172        |
| <b><u>VI.3.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.</u></b> | <b>177</b> |
| VI.3.1.- MELDOLA'S BLUE COMO MEDIADOR.                             | 177        |
| VI.3.2.- FERROCIANURO COMO MEDIADOR.                               | 183        |
| <b><u>VI.1.4.- ESTABILIDAD DE LOS BIOSENSORES</u></b>              | <b>187</b> |
| VI.4.1.- MELDOLA'S BLUE COMO MEDIADOR.                             | 188        |
| VI.4.2.- FERROCIANURO COMO MEDIADOR.                               | 190        |
| <b><u>VI.5. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES.</u></b>   | <b>191</b> |
| <b><u>VI.- BIBLIOGRAFÍA.</u></b>                                   | <b>195</b> |

## Capítulo VII: Determinación de EtOH utilizando microchips amperométricos.

|                                                                     |            |
|---------------------------------------------------------------------|------------|
| <b><u>VII.- OBJETIVOS.</u></b>                                      | <b>201</b> |
| <b><u>VII.1.- INTRODUCCIÓN.</u></b>                                 | <b>203</b> |
| <b><u>VII.2.- EXPERIMENTAL</u></b>                                  | <b>205</b> |
| VII.2.1.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE                             | 205        |
| VII.2.2.- EXPERIENCIAS PREVIAS.                                     | 207        |
| VII.2.3.- MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO.                    | 210        |
| <b><u>VII.3.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.</u></b> | <b>213</b> |
| <b><u>VII.4.- ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR.</u></b>                    | <b>219</b> |
| <b><u>VII.5.- LÍMITE DE DETECCIÓN.</u></b>                          | <b>221</b> |
| <b><u>VII.6. DETERMINACIÓN DE ETANOL EN MUESTRAS REALES.</u></b>    | <b>223</b> |
| <b><u>VII.- BIBLIOGRAFÍA.</u></b>                                   | <b>225</b> |

## Capítulo VIII: Determinación de glucosa utilizando electrodos serigráficos.

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| <b><u>VIII.- OBJETIVOS.</u></b> | <b>229</b> |
|---------------------------------|------------|

|                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| <b>VIII.1.- INTRODUCCIÓN.</b>                               | <b>231</b> |
| <b>VIII.2.- EXPERIMENTAL</b>                                | <b>233</b> |
| VIII.2.1.- REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARE.                   | 233        |
| VIII.2.2- MODIFICACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO.            | 234        |
| <b>VIII.3.- CARACTERIZACIÓN DEL BIOSENSOR</b>               | <b>236</b> |
| VIII.3.1 EXPERIENCIAS PREVIAS                               | 236        |
| VIII.3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.      | 238        |
| <b>VIII.4.- ESTABILIDAD DEL BIOSENSOR.</b>                  | <b>242</b> |
| <b>VIII.5. LÍMITE DE DETECCIÓN.</b>                         | <b>244</b> |
| <b>VIII.6. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN MUESTRAS REALES.</b> | <b>245</b> |
| <b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA</b>                                  | <b>249</b> |

## Capítulo IX: Conclusiones.

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>IX.- CONCLUSIONES</b> | <b>i</b> |
|--------------------------|----------|



La industria agroalimentaria española ha alcanzado un elevado grado de madurez y modernización adaptándose a los continuos cambios del entorno y a los hábitos de consumo. De esta forma ha llegado a convertirse en el primer sector industrial del país y en un componente altamente estratégico de la industria española.

La innovación y el desarrollo de la industria agroalimentaria pasan de forma genérica por dos ejes fundamentales: la seguridad y la calidad de los alimentos. La cada vez mayor complejidad de la cadena alimentaria exige, por otra parte, el desarrollo de eficaces sistemas de trazabilidad que aseguren la solidez de todos los eslabones.

La tecnología de biosensores ha experimentado un notable avance en los últimos años, debido fundamentalmente al desarrollo de dispositivos aplicados al área de biomedicina. Estas tecnologías, en avanzado estado de madurez, han ido transfiriéndose paulatinamente de forma horizontal a otros sectores como el medioambiental, y de forma más incipiente al agroalimentario.

Las características más destacables de estos dispositivos que los convierten en opciones altamente atractivas para competir en el mercado agroalimentario con otras tecnologías son su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo coste, entre otras.

En la construcción de sistemas integrados cobran especial relevancia las técnicas fotolitográficas ("*thin film*") y serigráficas ("*thick film*"). Así, el trabajo que aquí se presenta cuenta entre sus objetivos con el diseño, la producción y la caracterización de transductores miniaturizados, para lo que se recurrirá a estas tecnologías de microfabricación que proporcionan dispositivos de reducido tamaño, uniformes y bien definidos geoméricamente, lo que garantiza la reproducibilidad de los sensores construidos.

El uso de la tecnología microelectrónica está muy extendido en el desarrollo de nuevos sensores. En el capítulo III se describen los procesos de fabricación de distintos chips, cuya configuración se basa en distintas disposiciones de tres electrodos (trabajo, contraelectrodo y referencia), así como la caracterización electroquímica de los mismos. Gracias a las óptimas prestaciones de los sustratos de silicio y el bajo coste de su producción, cada vez se incorporan más microsistemas a una gran variedad de productos y procesos industriales.

Por otro lado, la tecnología serigráfica, basada en la deposición de tintas conductoras sobre un soporte inerte, no permite la fabricación de transductores de tamaño tan reducido como los anteriores pero no requiere de unas condiciones de fabricación controladas tan rigurosamente, permitiendo una mayor accesibilidad industrial. La fabricación de

dispositivos basados en configuraciones análogas a las anteriores se describen a lo largo del capítulo IV, así como su caracterización.

Especial atención en estas etapas de fabricación merece el electrodo de referencia. Mientras que en los modelos serigráficos este electrodo queda definido mediante la deposición de una capa de Ag/AgCl, en los fotolitográficos su integración no es tan trivial. Así, en el capítulo V se presentan diferentes alternativas para el desarrollo de este electrodo, incluyendo un diseño que combina las dos tecnologías.

Una vez descrita la fase de fabricación de los sensores, en los capítulos siguientes describe en su utilización para la fabricación de biosensores altamente selectivos a distintos analitos de interés en la industria alimentaria, incluso en muestras complejas.

El protocolo de construcción de los distintos biosensores cuenta con etapas comunes que se subdividen a su vez en otras, dependiendo del tipo de transductor y/o del tipo de aplicación.

La inmovilización del componente biológico es la primera de estas etapas comunes, y posiblemente, la que más influye en el funcionamiento del biosensor.

A continuación, se pone de manifiesto su validez a través de estudios de reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección, etc., en las condiciones idóneas de las variables experimentales que influyen en la respuesta electroquímica, optimizadas a través de la metodología del diseño de experimentos.

Aunque la puesta a punto y caracterización de un método analítico es importante en sí misma, su interés sería limitado si no fuera susceptible de ser

aplicado a la resolución de algún problema real. Por tanto, la viabilidad de los métodos puestos a punto se comprueba finalmente mediante su aplicación en muestras de mostos o vinos.

Así, en el capítulo VI se propone la construcción de biosensores para la determinación de glucosa tanto en muestras sintéticas como en mostos. Para ello se inmovilizan los enzimas Horse radish peroxidasa y Glucosa oxidasa sobre un chip de platino en una matriz polimérica.

De igual manera, el capítulo VII recoge la aplicación de un biosensor bienzimático, que combina los enzimas Alcohol oxidasa y Horse Radish peroxidasa, para el análisis de alcohol en muestras sintéticas y en vinos.

Sin duda alguna, la serigrafía cobra mayor importancia a la hora de fabricar dispositivos desechables, que son los que se presentan finalmente en el capítulo VIII. Una vez inmovilizados los enzimas Horse Radish peroxidasa y Glucosa oxidasa mediante entrecruzamiento con gluteraldehído, y caracterizados los biosensores, se aplican a la cuantificación de glucosa en mostos.

PRIMERA PARTE, ASPECTOS GENERALES.

---

---

## II.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

---

El creciente interés en la industria, especialmente en el sector alimentario, por realizar un control de calidad más rápido y económico así como por optimizar la producción mediante análisis en continuo ("*on-line*"), ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de métodos analíticos que sean compatibles con sus necesidades.

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [1].

Estas características, combinadas con la incorporación de los últimos avances en tecnologías planares de miniaturización, tanto de capa delgada como serigráficas, en la fabricación masiva de sensores, hacen de estos dispositivos unas herramientas de gran interés para la industria.

Existen dos clases de sensores clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar [1]:

- Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.)

- Químicos: Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc.

Actualmente, la mayor parte de sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos [2], pero la necesidad de obtener información química ha favorecido la investigación y el desarrollo de este tipo de sensores.

Desde que se describieron los primeros sensores químicos a principios del siglo XX [3,4], estos dispositivos han promovido una gran producción científica. Sin embargo, su aplicación en el campo industrial es muy limitada ya que su fabricación se suele realizar manualmente, y por tanto lleva asociado un elevado coste.

De esta manera, se pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos métodos de fabricación de sensores químicos que permitan una producción masiva, parcial o totalmente automatizada, reduciendo los costes de producción, y poder aprovechar así la gran potencialidad analítica que tienen estos dispositivos.

### **II.1.- Sensores químicos y biosensores.**

En el campo de la química analítica, la tendencia es simplificar el protocolo de análisis de una muestra determinada, reduciendo así los tiempos de análisis y su coste. Tradicionalmente se ha utilizado

instrumentación analítica muy sofisticada, tal como cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc, de coste elevado y que requiere especialización por parte del operario. Además, este tipo de equipos son incompatibles con análisis en continuo o pruebas de campo.

Si bien los sensores químicos se presentan como una clara alternativa, ya que permiten realizar análisis on-line, en detrimento, su sensibilidad y fiabilidad es mucho menor que la ofrecida por la instrumentación analítica convencional.

Los campos donde los sensores químicos han tenido una mayor implantación son principalmente, la biomedicina, el medioambiental y, en los últimos años, en la industria alimentaria, si bien otros sectores como la bioseguridad se están desarrollando de forma exponencial.

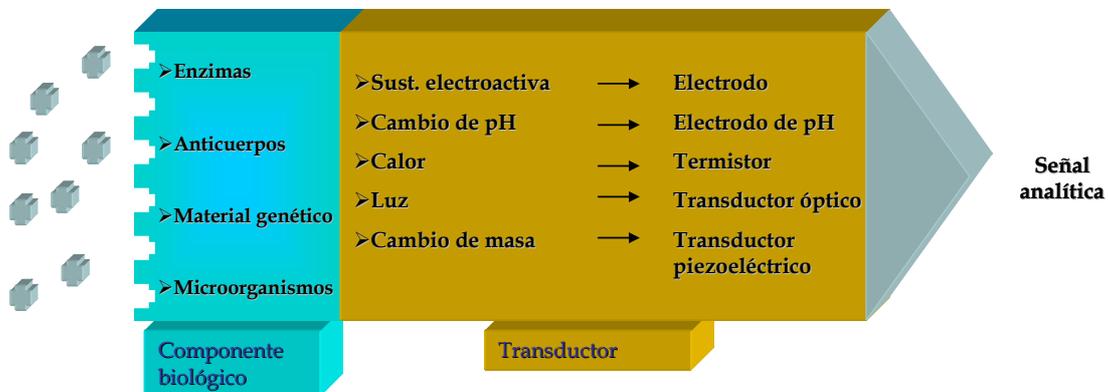
Entre este tipo de sensores caben destacar los biosensores, ya que son los dispositivos con más selectividad y por tanto, con más aplicaciones potenciales en química analítica. Desde hace varios años algunos de ellos ya han sido comercializados. Por ejemplo, los utilizados para los análisis de glucosa en sangre, de vital importancia en pacientes diabéticos.

### **II.1.1.- Definición y clasificación.**

Un sensor químico es un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica útil [1]. Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero.

El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor, que la transforma a su vez de una señal primaria a una señal secundaria procesable fácilmente, generalmente eléctrica u óptica. Existen tres tipos de receptores [5],

- Físicos, cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección, un ejemplo son los materiales piezoeléctricos utilizados para detectar cambios de masa.
- Químicos, la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelantes, ionóforos, etc.
- Biológicos, cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso, los sensores químicos son denominados biosensores (Fig. II.1.1),



**Figura II.1.1.** Esquema genérico de un biosensor.

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta la más aceptada [6]. En la tabla II.1.1 se recogen los distintos tipos de sensores y biosensores según este criterio.

**Tabla II.1.1.** *Clasificación de sensores químicos y biosensores según el transductor utilizado.*

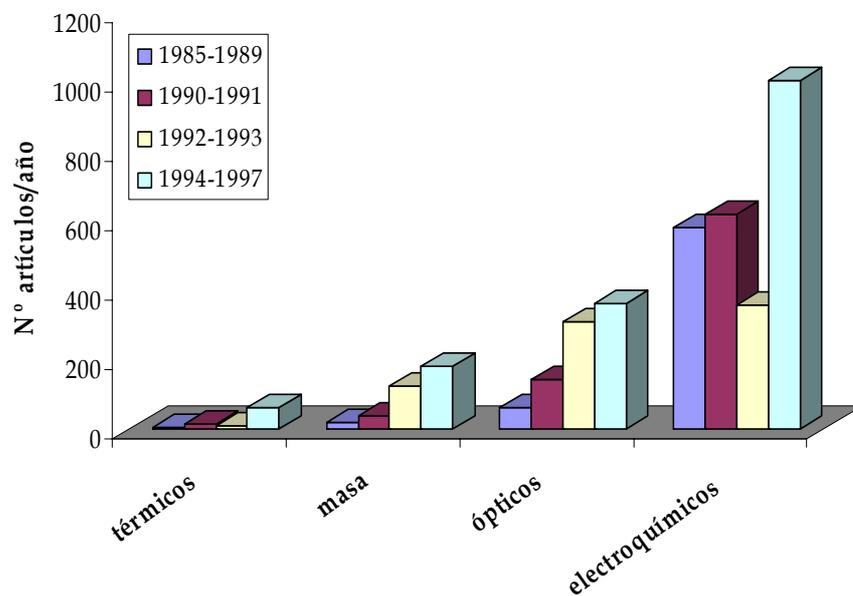
| Tipos de transductores | Descripción                                                                                                                            |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ópticos                | Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.                               |
| Electroquímicos        | La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.                                      |
| Piezoeléctricos        | Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas. |
| Térmicos               | Dispositivos capaces de medir el cambio de calor sobre la superficie del electrodo.                                                    |

A continuación se describen con más detalle el grupo de sensores electroquímicos ya que son los utilizados a lo largo del presente trabajo.

### II.1.2.- Transductores electroquímicos

En los últimos años, los transductores electroquímicos son los que más publicaciones científicas han generado (Fig. II.1.2) [7-9]. Esto está claramente ligado al hecho que estos dispositivos son más robustos, su fabricación es más

simple y económica que la del resto de transductores, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos [10]. De la misma manera, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potencióstatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.



**Figura II.1.2.** Número de publicaciones en sensores químicos en los últimos años.

Existen tres grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra; conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

### Transductores conductimétricos.

Este tipo de transductores se basan en la medida de cambios de conductividad (o alguna propiedad asociada a ésta) provocados por el analito, ya sea en la solución de medida o en la membrana selectiva. En algunos casos se puede llegar a medir cambios de conductividad del propio analito [7]. La conductividad es proporcional a la concentración de iones según la ecuación:

$$\Lambda = \frac{k}{C} \quad (1.1)$$

Donde  $k$  es la conductividad específica ( $S\text{ cm}^{-1}$ ) y  $C$  la concentración de iones ( $\text{mol cm}^{-3}$ ).

Las medidas de resistividad en corriente continua, son las más comunes para el funcionamiento de estos sensores, aunque para registrar medidas de impedancia se utiliza corriente alterna [11]. Estas medidas de impedancia se suelen utilizar para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas [12,13].

Estos dispositivos tienen una configuración muy simple, consistente en dos electrodos que pueden ser de diferentes materiales. Generalmente son de algún metal noble sin modificar, tal como oro, que puede detectar cambios de concentración del ácido sulfhídrico; y platino, paladio o rutenio que pueden ser utilizados para la detección de hidrógeno [14].

Se han desarrollado diferentes biosensores conductimétricos [15,16] mediante la modificación de electrodos con material biológico atrapado en polímeros conductores.

### Transductores potenciométricos.

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia.

La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst,

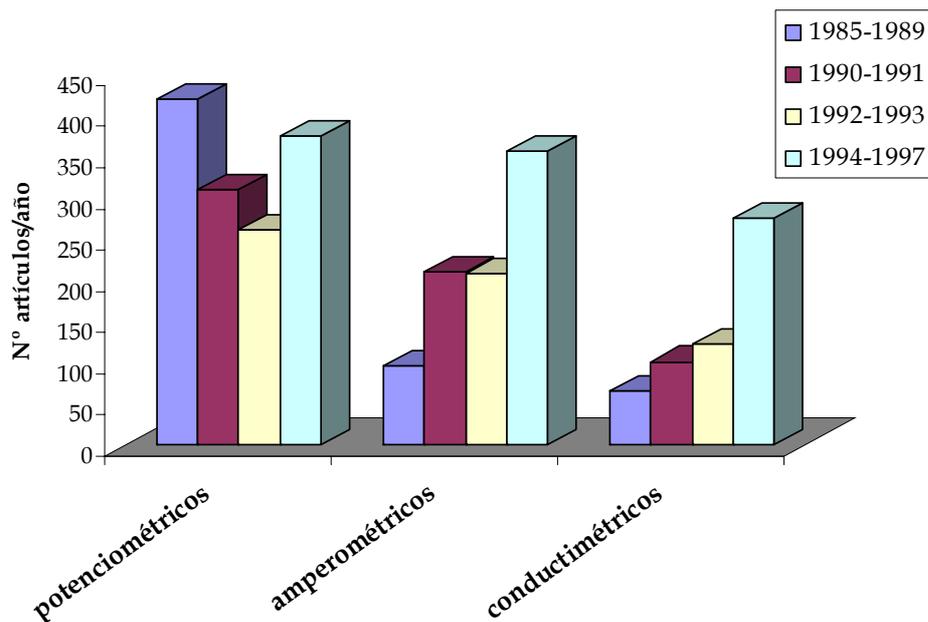
$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \left( a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} * a_j^{z_i/z_j} \right) \quad (1.2)$$

donde  $a_i$  es la actividad del ión principal,  $a_j$  la actividad del ión interferente,  $z_i$  y  $z_j$  las cargas de los iones principal e interferentes, y  $k_{i,j}^{pot}$  es el coeficiente de selectividad [17].

Los transductores potenciométricos son el grupo de dispositivos electroquímicos más desarrollados y estudiados (Fig. II.1.3). Históricamente, el origen de los sensores químicos se remonta a principios del siglo XX con el desarrollo del electrodo de vidrio [4], uno de los sensores potenciométricos más utilizados.

La mayor aplicación de este tipo de sensores es la fabricación de electrodos selectivos de iones (ISE's) [18-20], donde se modifica el electrodo de trabajo con una membrana selectiva a un ión determinado.

Los transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET's) [21] y su modificación con membranas selectivas (CHEMFET's) [22] también se incluyen dentro del grupo de sensores potenciométricos.



**Figura II.1.3.** Número de publicaciones en transductores electroquímicos en los últimos años [7].

### Transductores amperométricos.

Este tipo de dispositivos, se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de casos para completar la celda electroquímica [23]. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas variando el potencial de trabajo de forma controlada.

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva determinada y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo,

$$I = nFAD_o \frac{\delta(C_o(0,t))}{\delta x} \quad (1.3)$$

donde A es el área del electrodo de trabajo,  $D_0$  y  $C_0$  son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión ( $\delta$ ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito,

$$I = \frac{nFAD_o}{\delta} C_o \quad (1.4)$$

Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo de análisis médico. Ejemplos significativos de estos avances son los biosensores para medidas en sangre y suero.

En capítulos posteriores se describirá de manera más detallada el funcionamiento de este tipo de dispositivos.

### II.1.3.- Receptores biológicos.

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de biosensores es su alta selectividad, permitiendo diferenciar en algunos casos, isómeros de una misma molécula. Esta

particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en su aplicación como receptores en la fabricación de sensores.

Los biosensores, sobre todo los basados en transductores electroquímicos, son uno de los campos que más ha avanzado en cuanto a investigación en los últimos años.

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos:

- Anticuerpos.
- Ácidos nucleicos.
- Microorganismos.
- Tejidos orgánicos.
- Enzimas.

Los enzimas son los elementos mas comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación [24].

A continuación se describen los diferentes receptores, haciendo especial énfasis en los enzimas ya que son los utilizados en el presente trabajo.

### **Anticuerpos.**

Los anticuerpos son, junto con el ADN, los agentes biológicos más selectivos que existen. Debido a su estructura tridimensional puede enlazarse con una sustancia (antígeno) de una manera muy específica.

En los últimos diez años, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar inmunosensores [25]. El inconveniente de este tipo de material para aplicaciones en la fabricación de biosensores es que no tiene capacidad catalítica, lo que implica el empleo de anticuerpos o antígenos marcados, con un isótopo radioactivo, enzimas, partículas luminiscentes, etc [26].

En el caso de los inmunosensores basados en transductores amperométricos, el marcaje más utilizado es mediante enzimas [26]. La corriente recogida por el transductor es proporcional a la concentración de las especies electroactivas generadas por la reacción enzimática, y por tanto, proporcional a la cantidad de anticuerpos marcados [27].

### **Ácidos nucleicos.**

La alta especificidad de los pares de bases (adenina/timina y citosina/guanina) distribuidas a lo largo de la doble hélice que forma la cadena de ADN, hace de este material de gran interés en la fabricación de biosensores.

Como en otros biosensores, las cadenas cortas de ADN (ssADN) están inmovilizadas sobre superficies en forma de electrodos, chips o cristales según el tipo de transductor utilizado. La hibridación de esta molécula inmovilizada con su par es detectada por el transductor.

Como en el caso de los anticuerpos, este tipo de material no tiene capacidad catalítica, por tanto, para su detección necesita ser marcado [24]. En el caso de utilizar transductores amperométricos, éstos suelen estar modificados con enzimas.

Este tipo de detección es muy reciente [28,29]. Las primeras publicaciones basadas en transductores electroquímicos datan de los años 90 [30-32]. Por tanto, aún no se ha podido aprovechar el gran potencial de este material biológico.

### **Microorganismos.**

Los microorganismos tienen una gran importancia en diferentes procesos biotecnológicos, en la industria vitivinícola, en procesos de síntesis de fármacos, o en tratamientos de agua.

Muchos biosensores basados en células han sido desarrollados para el control de dichos procesos [24].

Los microorganismos pueden asimilar compuestos orgánicos y generar un cambio que es detectado por el transductor. Existen publicaciones donde se utilizan sensores amperométricos con microorganismos inmovilizados para el control de calidad de aguas residuales basados en el seguimiento de la respiración celular [33,34].

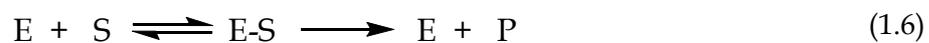
### **Tejidos orgánicos o celulares.**

Los tejidos orgánicos pueden ser utilizados como elemento de reconocimiento prácticamente sin preparación. Generalmente, tienen una gran variedad de enzimas inmovilizados, y por tanto no son tan selectivos como otros materiales biológicos. Por el contrario, están en su medio natural y es más difícil su degradación, lo que aumenta el tiempo de vida del biosensor.

El número de publicaciones existentes en este campo es mínimo comparado con otros receptores bioquímicos [35], aún así, se reportan algunos trabajos [36,37]. Un ejemplo de inmovilización sobre transductores electroquímicos es el publicado por Vieira et. al. [38], donde se inmoviliza tejido celular de una patata como fuente de peroxidasa, sobre un electrodo de grafito.

### **Enzimas.**

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción química, y sin consumirse. El mecanismo básico de la catálisis enzimática es el siguiente,



Donde S es el sustrato, E el enzima, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto.

La actividad enzimática, está regulada por el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura y, requiere en algunos casos, la presencia de un cofactor. El cofactor es un producto químico no proteico necesario para que la reacción enzimática se lleve a cabo, por ejemplo NAD<sup>+</sup> u oxígeno.

Los enzimas están formados por una estructura tridimensional compuesta por péptidos, con una zona activa que reacciona con el sustrato. Esta zona activa, que confiere especificidad a la enzima, suele estar situada en el interior del enzima.

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificados según el tipo de reacción que llevan a cabo,

- Transferasas, catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- Hidrolasas, catalizan reacciones de hidrólisis.
- Liasas, catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
- Isomerasas, catalizan la interconversión de isómeros.
- Ligasas, catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.
- Oxidoreductasas, catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Debido a esta capacidad redox, son el candidato ideal para su utilización como bioreceptores en biosensores electroquímicos.

Los enzimas fueron los primeros bioreceptores utilizados, y siguen siendo hoy en día los más empleados para la fabricación de biosensores.

Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, a parte de su alta selectividad, es su menor tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de bioreceptores. Como inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto.

Dos claros ejemplos de biosensores basados en enzimas son los utilizados para la determinación de glucosa [39,40] y urea [41,42].

### II.1.4.- Métodos de inmovilización.

La inmovilización del material biológico es un proceso mediante el que se confina el bioreceptor sobre el transductor electroquímico, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad.

Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada.

Como ventajas del empleo de material biológico inmovilizado cabe destacar [43],

- ✓ Aumento de la estabilidad del receptor biológico.
- ✓ Posible reutilización del biosensor, disminuyendo el coste del proceso.

Por otra parte, los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son [44],

- ✗ Alteración de la conformación del material biológico respecto su estado nativo.
- ✗ En el caso de la utilización de enzimas, pérdidas de su actividad catalítica.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes grupos [44]; retención física y unión química (Fig. II.1.4)



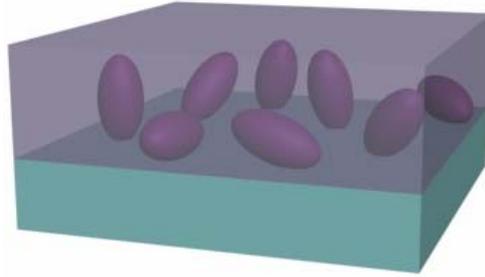
**Figura II.1.4:** Clasificación de los métodos de inmovilización.

A continuación se describen, con más detalle, cada uno de los tipos de inmovilización enzimática, ya que es el componente biológico empleado en este trabajo.

### **Atrapamiento.**

Consiste en la retención física del enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (Fig. II.1.5), constituida generalmente por monómeros fotocurables o polímeros del tipo poliacrilamina, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. También se suelen utilizar hidrogeles [45] como poly(2-hidroxyetil metacrilato) (p(HEMA)) o polímeros conductores, como polipirrol [46].

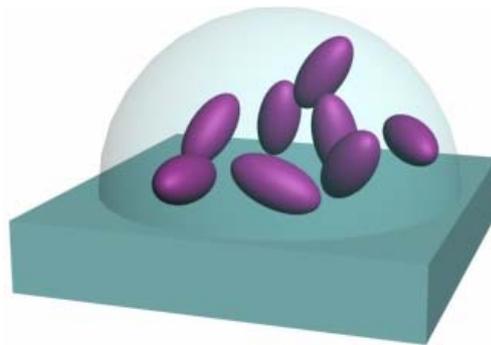
Es una técnica de gran sencillez desde el punto de vista experimental, y no requiere una gran cantidad de material biológico. Como ventaja adicional, el enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Uno de los inconvenientes es la gran barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor [6]. El atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, ya que pueden alterarse los grupos reactivos de la proteína, lo que provocaría pérdidas en la actividad enzimática.



**Figura II.1.5:** *Inmovilización enzimática por atrapamiento.*

### **Microencapsulación.**

En esta técnica, los enzimas están rodeados de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no del enzima (Fig. II.1.6).



**Figura II.1.6:** *Inmovilización enzimática mediante microencapsulación.*

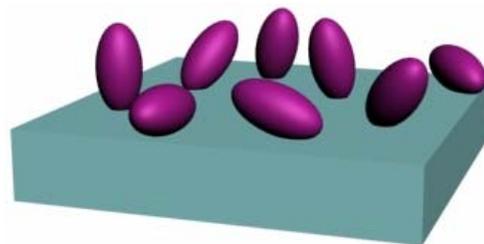
Este método permite que el material biológico esté en contacto directo con el transductor, manteniendo, a su vez, la alta selectividad de los enzimas puesto que no se ven afectados por los cambios de pH, temperatura o fuerza iónica en el medio [24].

### Adsorción en la superficie.

En la adsorción el enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas (Fig. II.1.7), fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Se suelen utilizar diferentes sustancias con gran capacidad de adsorber material biológico, como por ejemplo alúmina, arcillas, grafito y sílica gel. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- ✓ El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- ✓ La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción del enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
- ✓ El diámetro del poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor del enzima.
- ✓ La presencia de iones que actúen como cofactores del enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Es un método de preparación sencilla, bajo coste y que no implica cambios de especificidad enzimática, pero tiene como inconvenientes que es poco estable desde el punto de vista mecánico y que la unión con el soporte es débil.



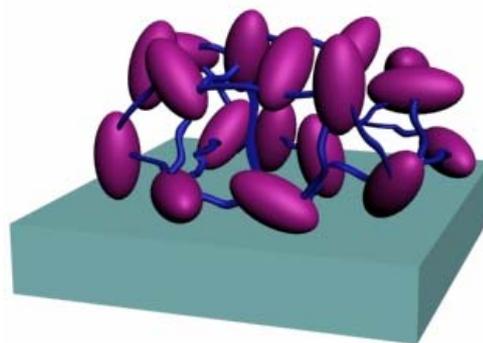
**Figura II.1.7:** *Inmovilización enzimática por adsorción sobre la superficie.*

### Entrecruzamiento (*cross-linking*)

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la estabilización de enzimas [47]. El método consiste en la utilización de reactivos bifuncionales (dialdehidos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida) que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima (Fig. II.1.8). Los entrecruzadores más utilizados son gluteraldehido, hexametildisocianato y 1,5-dinitro-2,4-diflorobenzeno [6].

El entrecruzamiento permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, entrecruzando el material biológico con proteínas sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina como, por ejemplo, la seroalbúmina bovina (BSA) [44].

Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar el enzima por adsorción en una matriz polimérica, consiguiéndose así una elevada carga enzimática, y posteriormente modificarlo con entrecruzadores [48,49].



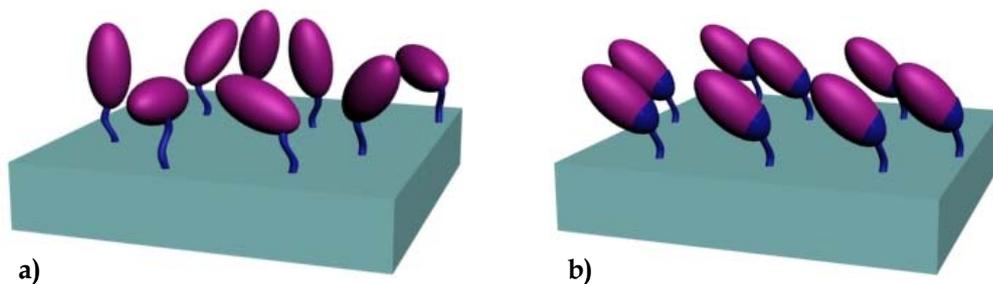
**Figura II.1.8:** Inmovilización enzimática mediante entrecruzamiento.

### Unión covalente.

La metodología de la unión covalente entre el transductor y la enzima se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de los enzimas, los más empleados para la formación de enlaces covalentes son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente [24].

Este tipo de inmovilización precisa del control de parámetros como el pH o la fuerza iónica de la solución, así como disponer de una superficie del transductor perfectamente limpia. La gran ventaja de este método es que permite conseguir tiempos de vida muy largos, entre 4 y 14 meses [6].

En la figura II.1.9 se muestran los dos tipos de inmovilización mediante unión covalente existentes, en función si el enzima esta o no orientado.

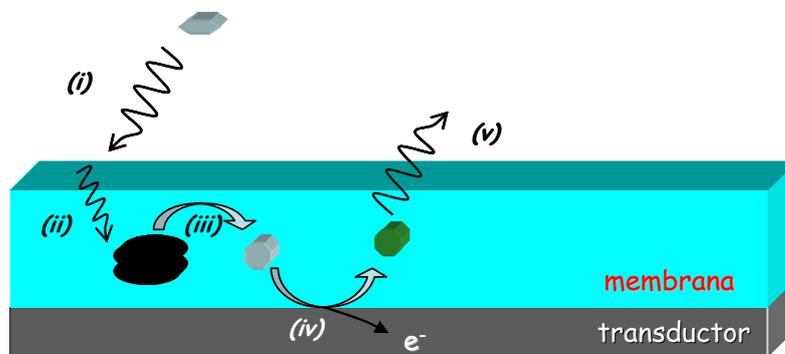


**Figura II.1.9:** Inmovilización enzimática mediante unión covalente. a) no orientada, b) orientada..

### II.1.5.- Biosensor amperométrico enzimático.

La primera publicación científica sobre un biosensor amperométrico se remonta a 1962, por Clark y Lions, para la determinación de glucosa en sangre [50]. Desde entonces, estos dispositivos, especialmente los utilizados para la determinación de glucosa, han sido de los más estudiados [51].

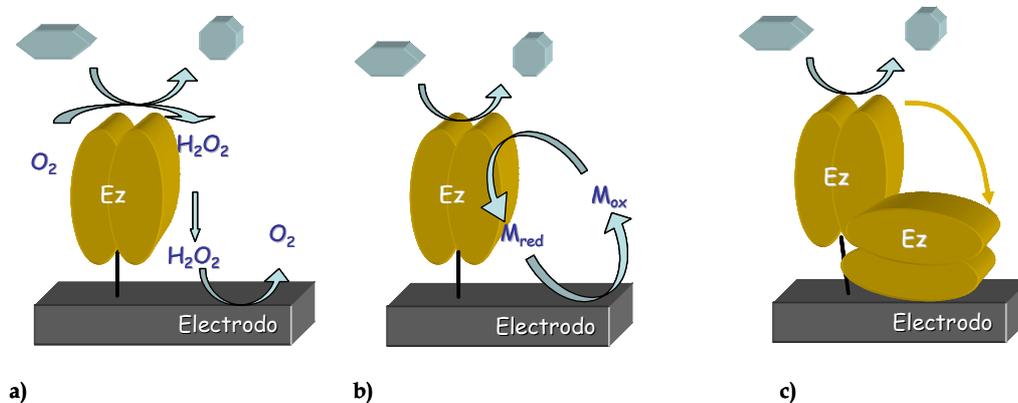
Los biosensores combinan la elevada selectividad de los enzimas con la simplicidad de los transductores amperométricos. En la figura II.1.10 se muestra el funcionamiento básico de este tipo de dispositivos. El analito difunde, primero a través de la solución (i) y después a través de la membrana (ii) (en el caso de existir), hasta entrar en contacto con el centro activo del enzima, donde reacciona generando un producto, generalmente con propiedades redox (iii). Éste es oxidado o reducido sobre el electrodo (iv), generando un producto que difunde de nuevo a la solución (v) [17].



**Figura II.1.10:** Esquema de un biosensor de glucosa. (i) difusión del analito y del cofactor al interior de la membrana; (ii) reacción enzimática; (iii) difusión de los productos hacia el electrodo y fuera de la membrana; (iv) reacción electroquímica; (v) difusión de los productos de la reacción electroquímica hacia la muestra.

La intensidad recogida, es proporcional a la concentración del analito según la ley de Faraday (eq. 1.4) estando limitada por los pasos (i) (ii) (iii). La reacción electroquímica suele ser mucho más rápida que la enzimática, por tanto no se puede considerar un paso limitante del mecanismo global.

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre el enzima y el transductor amperométrico, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores amperométricos (Fig II.1.11).



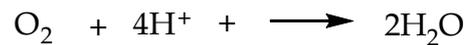
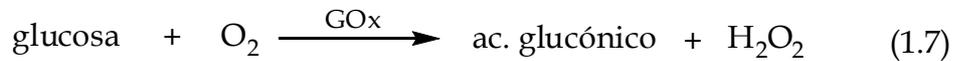
**Figura II.1.11:** Esquema de las tres generaciones de biosensores basados en oxireductasas. (a) Primera, (b) segunda y (c) tercera generación.

### Primera generación.

Están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática. Por tanto, es necesario que la sustancia analizada tenga propiedades electroquímicas.

El electrodo de Clark pertenece a este grupo. Consiste en una membrana, compuesta por Glucosa oxidasa (GOx), inmovilizada sobre un electrodo que determina las variaciones de oxígeno en el medio. La

concentración de glucosa presente en el medio es cuantificada mediante la reducción del oxígeno en el cátodo de platino a - 700 mV, de acuerdo con el siguiente mecanismo,



En 1973, Guilbault y Lubrano [52], desarrollaron un nuevo tipo de biosensor de primera generación basado en la oxidación del agua oxigenada generada por la reacción enzimática,



En el caso de biosensores basados en deshidrogenasas, enzimas que facilitan el paso de protones de una especie a otra; es necesaria la presencia del cofactor nicotinamida adenín dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ). El seguimiento de la reacción catalítica se realiza mediante la oxidación de  $\text{NADH}$ ,



El inconveniente de estos cofactores es la necesidad de aplicar sobrepotenciales muy altos, que pueden oxidar o reducir a su vez otros analitos que haya en el medio (interferentes). Además, en este tipo de reacciones se dan procesos de polimerización de los productos de reacción, que suelen pasivar la superficie del electrodo. Todo esto condujo a la utilización de mediadores, lo que dio paso a la segunda generación de biosensores amperométricos [53,54].

### **Segunda generación.**

La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo.

El mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural del enzima [51]. Es necesario también que tenga buenas propiedades electroquímicas, por ejemplo un potencial redox próximo a cero, con lo que se consiguen eliminar las reacciones redox de posibles interferentes [55].

Los mediadores más utilizados, libres en disolución o inmovilizados junto con los enzimas, son entre otros el par ferri/ferrocianuro, 1,4-benzoquinona, derivados del ferroceno, Meldola's blue y azul de metileno [17].

El primer biosensor de segunda generación data de 1984, fue desarrollado por Cass y Davis, con ferroceno como mediador [56].

### **Tercera generación.**

Aquí, la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa (Fig. II.1.11 c). Este tipo de biosensores muestra una mayor selectividad, puesto que trabajan a potenciales muy próximos a los intrínsecos del enzima, quedando menos expuestos a posibles interferentes [54]. En los últimos años se han desarrollado diferentes trabajos basados en este tipo de transferencia electrónica [57-59].

Una de las mayores dificultades en la construcción de este tipo de biosensores es como optimizar la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. La gran mayoría de enzimas tiene el centro activo en su interior y hace imposible un contacto directo entre éste y la superficie del transductor. Uno de los enzimas más viables para su utilización en este tipo de biosensores es Horse Radish peroxidasa ya que su centro activo no está en el interior (HRP) [17, 60].

### **II.1.6.- Biosensores miniaturizados.**

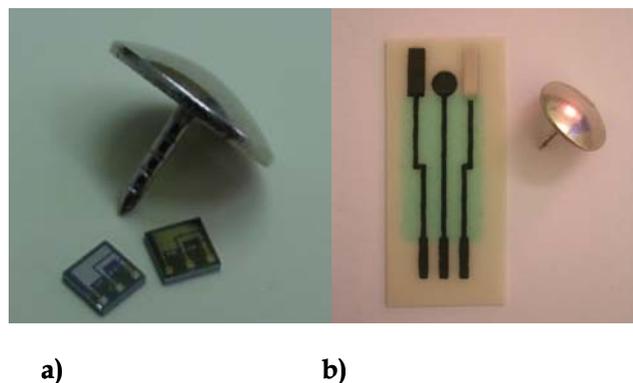
Ha sido especialmente en estos últimos 30 años cuando los biosensores electroquímicos han cobrado gran importancia, especialmente en sus aplicaciones industriales. Esto ha sido debido a la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costes en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área pequeña [61] de los dos o tres electrodos requeridos habitualmente para la realización de medidas voltamperométricas.

Otra de las ventajas que presenta el uso de biosensores miniaturizados, es el mínimo consumo de reactivos. Disponer de un área de trabajo mucho menor, requiere menos cantidad de material biológico en la fabricación, a la vez que permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños. Por otra parte, estas dimensiones reducidas permiten realizar análisis rápidos y hacer un seguimiento de los productos incluso en continuo (“on-line”) e in situ. Por el contrario, la instrumentación que se requiere ha de ser mucho más sensible, ya que la señal que se debe tratar es mucho menor [62].

En el presente trabajo se han utilizado dos tecnologías de miniaturización diferentes, capa delgada o “*thin film*” y capa gruesa o “*thick film*”.

La tecnología “*thin film*” esta basada en técnicas fotolitográficas, empleadas generalmente para la fabricación de dispositivos electrónicos basados en silicio [9]. El primer sensor químico fabricado con esta tecnología, en la decada de los setenta, fue el CHEMFET [63]. Esta tecnología permite la fabricación de transductores de tamaño muy reducido (Fig II.1.12a), pero necesita de instalaciones de elevado coste, ya que su fabricación se ha de llevar a cabo en una sala blanca.

Por otro lado, la tecnología “*thick film*” o serigráfica consiste en la deposición de tintas conductoras sobre un soporte inerte, generalmente de PVC [64]. Esta metodología no permite la fabricación de transductores de tamaño tan reducido como los anteriormente descritos (Fig. II.1.12b), pero no requiere de unas instalaciones sujetas a unas condiciones ambientales controladas con tanto rigor.



**Figura II.1.12:** Transductores amperométricos fabricados con tecnología micro-electrónica (a) y serigráfica (b).

## **II.2 Aplicaciones industriales.**

Desde la publicación del primer biosensor amperométrico el interés de la industria por este tipo de dispositivos ha crecido en gran medida [65], especialmente desde la aplicación de las diferentes tecnologías de miniaturización, que permiten la fabricación en masa a bajo coste.

Las industrias más beneficiadas por la utilización de estos dispositivos han sido la clínica, la medioambiental y, en los últimos años, la alimentaria. Todas ellas requieren instrumentación capaz de realizar análisis rápidos, y sin necesidad de ser efectuados en laboratorios. Estas necesidades quedan cubiertas ampliamente por los biosensores [6].

### **Aplicaciones médicas.**

El análisis de sangre, orina y suero es esencial en la medicina actual. Generalmente, éstos se llevan a cabo en laboratorios clínicos mediante análisis químicos convencionales que precisan de varios días para dar un resultado. En algunos casos es insuficiente; pacientes ingresados en cuidados intensivos necesitan de una constante monitorización de ciertos parámetros, como la glucosa, el oxígeno o el dióxido de carbono en sangre.

El biosensor para la determinación de glucosa en sangre es, posiblemente, el más estudiado y comercializado dentro de la industria biomédica. La diabetes es una enfermedad extendida a nivel mundial, y el control de los niveles de glucosa en sangre mediante un método rápido y sencillo es vital.

En 1975, la empresa YSI, comercializó el primer biosensor para la determinación de glucosa en sangre [51], basado en el electrodo de Clark y Lions, anteriormente descrito.

A lo largo de los años ochenta, con la introducción de tecnologías de miniaturización y fabricación en masa, la comercialización de los biosensores para la determinación de glucosa aumentó de forma considerable. A finales de esta década se comercializaron los primeros electrodos desechables para este análisis, fabricados con tecnología serigráfica [66,67] e incluso las primeras tintas conductoras modificadas con Glucosa oxidasa [68].

En los últimos años, el desarrollo de estos dispositivos se ha dirigido hacia las medidas in vivo, mediante implantes subcutáneos que el mismo paciente puede reemplazar [69].

En el año 2000, la empresa Cygnus lanzó al mercado un nuevo dispositivo, GlucoWatch (Fig. II.2.1), capaz de monitorizar el nivel de glucosa en sangre de una manera continua y no invasiva.



**Figura II.2.1:** *GlucoWatch, desarrollado por Cygnus.*

Basándose en la misma tecnología desarrollada para el biosensor de glucosa, se han desarrollado dispositivos para la determinación de otros analitos, como fructosa, etanol, lactosa o L-lactato [6], pero ninguno de ellos ha llegado a tener un mercado tan amplio como el primero.

### **Aplicaciones medioambientales.**

El aumento de la contaminación ambiental ha hecho que aumente la demanda de tecnologías capaces de monitorizar la concentración de contaminantes en agua y en aire [70]. Los biosensores son una importante herramienta para este fin, especialmente en el control de aguas tanto potables como residuales.

Se han desarrollado biosensores enzimáticos para determinación de diversos contaminantes, como fosfatos, pesticidas, fenoles y metales pesados.

En 1975, Guilbault desarrolló el primer biosensor para la determinación de fosfatos [71], basado en las enzimas Fosfatasa alcalina y Glucosa oxidasa. Debido a que la detección de fosfatos precisa medidas inferiores a ppb, en los últimos años se han desarrollado dispositivos capaces de alcanzar un menor límite de detección [72].

Organofosfatos y carbamatos son utilizados comúnmente en agricultura como insecticidas, pese a su toxicidad. Bernabei et. al. [73] desarrollaron un biosensor para la determinación de estos dos compuestos, basados en la inhibición de la Acetilcolinesterasa.

Los metales pesados son uno de los grandes contaminantes de nuestro tiempo, ya que no son biodegradables [74]. La acción inhibidora de estos

metales sobre oxidasas y deshidrogenasas se ha utilizado para desarrollar biosensores para su cuantificación [75,76].

### **Aplicaciones en la industria alimentaria.**

El análisis alimentario es uno de los campos donde los biosensores tienen un mayor potencial para su aplicación, en la evaluación de la calidad, composición y frescura de los alimentos.

Existe un gran número de publicaciones sobre aplicaciones de biosensores en la industria alimentaria [77]. La gran mayoría se centra en el análisis de carbohidratos, como glucosa, fructosa y lactosa en leche, zumos y mieles [46, 78-80].

La aplicación de biosensores en este campo es relativamente reciente, por lo que existen muy pocos equipos comerciales basados en biosensores enzimáticos [77].

La industria vitivinícola ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años y, por tanto, ha aumentado el interés en la aplicación de estos dispositivos analíticos tanto en el control de calidad de la uva y el vino, como en el seguimiento de la fermentación.

Los análisis necesarios para el control de calidad del vino, son largos y costosos y necesitan de técnicos especializados en control de calidad alimentaria [81]. Recientemente se han publicado diferentes biosensores amperométricos, no miniaturizados, para la determinación de glucosa, fructosa y etanol en vino [46, 82-84], que obvian estos inconvenientes.

## II.- Bibliografía.

1. L. Ristic, *Sensor technology and devices*, ed. I. Artech House. **1994**, Norwood.
2. N. Graber, H. Ludi, y H. M. Widmer, *The use of chemical sensors in industry. Sensors and Actuators B: Chemical*, **1990**. 1(1-6): p. 239-243.
3. W. H. Göpel, J.;Zemel,J.N. (Editores), *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 1*, ed. W. VCN. **1989**.
4. W. H. Göpel, J.;Zemel,J.N. (Editores), *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 2*, ed. W. VCN. **1991**.
5. A. K. Turner, Isao; Wilson, George, *Biosensors: fundamentals and applications*, ed. O.U. Press. **1987**, New York.
6. B. Eiggins, *Biosensors, an introduction*. **1996**: John Wiley & Sons Ltd.
7. J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, y D. M. DeVaney, *Chemical sensors. Analytical Chemistry*, **1998**. 70(12): p. 179R-208R.
8. J. Janata, M. Josowicz, y D. M. Devaney, *Chemical Sensors. Analytical Chemistry*, **1994**. 66(12): p. R207-R228.
9. J. Janata, *Centennial retrospective on chemical sensors. Analytical Chemistry*, **2001**. 73(5): p. 150A-153A.
10. C. Galan, *Desarrollo de sensores químicos y biosensores por tecnología thick-film*, in *Departamento de Química*. **1996**, Universidad Autonoma de Barcelona: Bellaterra.
11. C. J. McNeil, D. Athey, M. Ball, W. O. Ho, S. Krause, R. D. Armstrong, J. D. Wright, y K. Rawson, *Electrochemical Sensors Based on Impedance Measurement*

- of Enzyme-Catalyzed Polymer Dissolution - Theory and Applications*. Analytical Chemistry, **1995**. 67(21): p. 3928-3935.
12. T. Hofmann, K. Schroder, J. Zacheja, y J. Binder, *Fluid characterization using sensor elements based on interdigitated electrodes*. Sensors and Actuators B-Chemical, **1996**. 37(1-2): p. 37-42.
  13. E. Katzy I. Willner, *Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors*. Electroanalysis, **2003**. 15(11): p. 913-947.
  14. E. Souteyrand, D. Nicolas, E. Queau, y J. R. Martin, *Influence of Surface Modifications on Semiconductor Gas Sensor Behavior*. Sensors and Actuators B-Chemical, **1995**. 26(1-3): p. 174-178.
  15. M. M. Castillo-Ortega, D. E. Rodriguez, J. C. Encinas, M. Plascencia, F. A. Mendez-Velarde, y R. Olayo, *Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2002**. 85(1-2): p. 19-25.
  16. A. Q. Contractor, T. N. Sureshkumar, R. Narayanan, S. Sukeerthi, R. Lal, y R. S. Srinivasa, *Conducting polymer-based biosensors*. Electrochimica Acta, **1994**. 39(8-9): p. 1321-1324.
  17. M. Pravda, *Applications of Electrochemical Sensors and Detection Systems in Biomedical Analysis*, in *Pharmaceutical Sciences*. **1998**, University of Pardubice: Pardubice.
  18. R. A. Saary J. H. Weber, *Comparison of Spectrofluorometry and Ion-Selective Electrode Potentiometry for Determination of Complexes between Fulvic-Acid and Heavy-Metal Ions*. Analytical Chemistry, **1980**. 52(13): p. 2095-2100.

19. Y. Taniy Y. Umezawa, *Ion-selective electrodes*. *Sensor Letters*, **2005**. 3(2): p. 99-107.
  20. M. MajZurawska, *Ion selective magnesium electrodes and their application in analytical chemistry*. *Chemia Analityczna*, **1997**. 42(2): p. 187-197.
  21. C. Jimenez, L. Moreno, C. de Haro, F. X. Munoz, A. Florido, P. Rivas, M. Fernandez, P. L. Martin, A. Bratov, y C. Dominguez, *Development of a multiparametric system based on solid-state microsensors for monitoring a nuclear waste repository*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2003**. 91(1-3): p. 103-108.
  22. L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova, C. Jimenez, y A. Bratov, *Multi-sensor array used as an "electronic tongue" for mineral water analysis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*
- ISOEN 2005 - Selected Papers from the 11th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses - Barcelona, Spain, 13-15 April 2005., **2006**. 116(1-2): p. 130-134.
23. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, y G. S. Wilson, *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2001**. 16(1-2): p. 121-131.
  24. B. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, ed. L. WileyJohn Wiley and Sons. **2002**, England.
  25. D. Griffithsy G. Hall, *Biosensors - What Real Progress Is Being Made*. *Trends in Biotechnology*, **1993**. 11(4): p. 122-130.
  26. M.-P. Marco, S. Gee, y B. D. Hammock, *Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry Biosensors for environmental monitoring*, **1995**. 14(7): p. 341-350.

27. M. Diaz-Gonzalez, M. B. Gonzalez-Garcia, y A. Costa-Garcia, *Recent advances in electrochemical enzyme immunoassays*. *Electroanalysis*, **2005**. 17(21): p. 1901-1918.
28. J. H. Zhai, H. Cui, y R. F. Yang, *DNA based biosensors*. *Biotechnology Advances*, **1997**. 15(1): p. 43-58.
29. S. Zhang, G. Wright, y Y. Yang, *Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2000**. 15(5-6): p. 273-282.
30. K. M. Millan, A. Saraullo, y S. R. Mikkelsen, *Voltammetric DNA Biosensor for Cystic-Fibrosis Based on a Modified Carbon-Paste Electrode*. *Analytical Chemistry*, **1994**. 66(18): p. 2943-2948.
31. K. M. Millany S. R. Mikkelsen, *Sequence-Selective Biosensor for DNA-Based on Electroactive Hybridization Indicators*. *Analytical Chemistry*, **1993**. 65(17): p. 2317-2323.
32. K. M. Millan, A. J. Spurmanis, y S. R. Mikkelsen, *Covalent Immobilization of DNA onto Glassy-Carbon Electrodes*. *Electroanalysis*, **1992**. 4(10): p. 929-932.
33. E. Vaiopoulou, P. Melidis, E. Kampragou, y A. Aivasidis, *On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2005**. 21(2): p. 365-371.
34. C. M. Ruan, L. J. Yang, y Y. B. Li, *Rapid detection of viable Salmonella typhimurium in a selective medium by monitoring oxygen consumption with electrochemical cyclic voltammetry*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2002**. 519(1-2): p. 33-38.
35. A. J. Baeumner, *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**. 377(3): p. 434-445.

36. S. Jiao, W. C. Zhang, J. K. Cao, Z. M. Zhang, H. Wang, M. C. Ding, Z. Zhang, J. B. Sun, Y. C. Sun, y M. T. Shi, *Study of Adrenal-Medullary Tissue-Transplantation to Striatum in Parkinsonism*. *Progress in Brain Research*, **1988**. 78: p. 575-580.
37. J. S. Sidwelly G. A. Rechnitz, *Bananatrode - an Electrochemical Biosensor for Dopamine*. *Biotechnology Letters*, **1985**. 7(6): p. 419-422.
38. L. C. Vieira, K. O. Lupetti, y O. Fatibello, *Sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) tissue as a biocatalyst in a paraffin/graphite biosensor for hydrazine determination in boiler feed water*. *Analytical Letters*, **2002**. 35(14): p. 2221-2231.
39. M. Topcu Sulak, O. Gokdogan, A. Gulce, y H. Gulce, *Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**. 21(9): p. 1719-1726.
40. G. E. De Benedetto, F. Palmisano, y P. G. Zambonin, *One-step fabrication of a bienzyme glucose sensor based on glucose oxidase and peroxidase immobilized onto a poly(pyrrole) modified glassy carbon electrode*. *Biosensors and Bioelectronics*, **1996**. 11(10): p. 1001-1008.
41. S. B. Adeloju, S. J. Shaw, y G. G. Wallace, *Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea*. *Analytica Chimica Acta*, **1996**. 323(1-3): p. 107-113.
42. F. Kuralay, H. Ozyoruk, y A. Yildiz, *Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2006**. 114(1): p. 500-506.
43. W. Hartmeier, *Immobilized Biocatalysts - from Simple to Complex-Systems*. *Trends in Biotechnology*, **1985**. 3(6): p. 149-153.
44. M. Arroyo, *Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications*. *Ars pharmaceutica*, **1998**. 39(2): p. 93-157.

45. D. Ivekovic, S. Milardovic, y B. S. Grabaric, *Palladium hexacyanoferrate hydrogel as a novel and simple enzyme immobilization matrix for amperometric biosensors*. *Biosensors & Bioelectronics*, **2004**. 20(4): p. 872-878.
46. M. A. Alonso Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, y F. J. Muñoz Pascual, *Biosensor based on platinum chips for glucose determination*. *Analytica Chimica Acta*, **2005**. 547(2): p. 209-214.
47. S. S. Wongy L. J. C. Wong, *Chemical Cross-Linking and the Stabilization of Proteins and Enzymes*. *Enzyme and Microbial Technology*, **1992**. 14(11): p. 866-874.
48. S. A. Barker, *Immobilization of the biological component of biosensors*, in *Biosensors Fundamentals and applications.*, A.P.F.K. Turner, I., Editor. **1987**, Oxford University Press: New York.
49. C. Jimenez, J. Bartrol, N. F. de Rooij, y M. Koudelka-Hep, *Use of photopolymerizable membranes based on polyacrylamide hydrogels for enzymatic microsensor construction*. *Analytica Chimica Acta*, **1997**. 351(1-3): p. 169-176.
50. L. C. L. J. R. L. C. Clark, *Ann. N.Y. Acad. Sci*, **1962**. 102: p. 28.
51. J. Wang, *Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges*. *Electroanalysis*, **2001**. 13(12): p. 983-988.
52. G. L. Guilbault, G., *Anal. Chim. Acta.*, **1973**. 64: p. 439.
53. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, y I. Gazaryan, *Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors*. *Analytica Chimica Acta*, **1999**. 400(1-3): p. 91-108.

54. R. S. P. Freire, Christiana; Mello, Lucilene; Kubota, Lauro, *Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity*. J. Braz. Chem. Soc., **2003**. 14(2): p. 230-243.
55. A. Chaubey B. D. Malhotra, *Mediated biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, **2002**. 17(6-7): p. 441-456.
56. A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, y A. P. F. Turner, *Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose*. Analytical Chemistry, **1984**. 56(4): p. 667-671.
57. A. L. Ghindilis, P. Atanasov, y E. Wilkins, *Potentiometric immunoelectrode for fast assay based on direct electron transfer catalyzed by peroxidase*. Sensors and Actuators B-Chemical, **1996**. 34(1-3): p. 528-532.
58. K. V. Gobiy F. Mizutani, *Layer-by-layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2001**. 80(3): p. 272-277.
59. Y. Tian, L. Mao, T. Okajima, y T. Ohsaka, *Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion*. Analytical Chemistry, **2002**. 74(10): p. 2428-2434.
60. S. Xuy X. Han, *A novel method to construct a third-generation biosensor: self-assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres*. Biosensors and Bioelectronics, **2004**. 19(9): p. 1117-1120.
61. H. Wohltjen, *Chemical Microsensors and Microinstrumentation*. Analytical Chemistry, **1984**. 56(1): p. A87-&.
62. M. A. Tartagni, L.; Guerrieri, R, *Microelectronic Chip for Molecular and Cell Biology*, in *Sensor Update*, Wiley-VCH, Editor. **2004**: Weinheim. p. 156-197.

63. J. N. Zemel, *Ion-Sensitive Field-Effect Transistors and Related Devices*. Analytical Chemistry, **1975**. 47(2): p. A255-&.
64. V. B. Nascimentoy L. Angnes, *Screen-printed electrodes*. Quimica Nova, **1998**. 21(5): p. 614-629.
65. J. F. Liang, Y. T. Li, y V. C. Yang, *Biomedical application of immobilized enzymes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, **2000**. 89(8): p. 979-990.
66. P. I. Hilditchy M. J. Green, *Disposable Electrochemical Biosensors*. Analyst, **1991**. 116(12): p. 1217-1220.
67. D. Matthewsy R. Holman, *Evaluation of a New Blood-Glucose Meter - Reply*. Lancet, **1987**. 1(8543): p. 1205-1206.
68. R. W. Murray, A. G. Ewing, y R. A. Durst, *Chemically Modified Electrodes - Molecular Design for Electroanalysis*. Analytical Chemistry, **1987**. 59(5): p. A379-&.
69. C. Henry, *Getting under the skin: Implantable glucose sensors*. Analytical Chemistry, **1998**. 70(17): p. 594A-598A.
70. I. Karubey Y. Nomura, *Enzyme sensors for environmental analysis*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2000**. 10(1-3): p. 177-181.
71. G. G. Guilbaulty M. Nanjo, *Phosphate-Selective Electrode Based on Immobilized Alkaline-Phosphatase and Glucose Oxidase*. Analytica Chimica Acta, **1975**. 78(1): p. 69-80.
72. U. Wollenbergery F. W. Scheller, *Enzyme activation for activator and enzyme activity measurement*. Biosensors and Bioelectronics, **1993**. 8(6): p. 291-297.
73. M. Bernabei, S. Chiavarini, C. Cremisini, y G. Palleschi, *Anticholinesterase activity measurement by a choline biosensor: application in water analysis*. Biosensors and Bioelectronics, **1993**. 8(5): p. 265-271.

74. N. Vermay M. Singh, *Biosensors for heavy metals*. *Biometals*, **2005**. 18(2): p. 121-129.
75. P. Corbisier, D. van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csoregi, G. Johansson, y B. Mattiasson, *Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples*. *Analytica Chimica Acta*, **1999**. 387(3): p. 235-244.
76. T. Krawczynski vel Krawczyk, M. Moszczyńska, y M. Trojanowicz, *Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2000**. 15(11-12): p. 681-691.
77. L. D. Melloy L. T. Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. *Food Chemistry*, **2002**. 77(2): p. 237-256.
78. V. G. Gavalas, M. G. Fouskaki, y N. A. Chaniotakis, *Novel pre-oxidizing cell for elimination of electroactive interferents during biosensor analysis. Application to glucose determination in real samples*. *Analytical Letters*, **2000**. 33(12): p. 2391-2405.
79. D. Moscone, R. A. Bernardo, E. Marconi, A. Amine, y G. Palleschi, *Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors*. *Analyst*, **1999**. 124(3): p. 325-329.
80. P. A. Paredes, J. Parellada, V. M. Fernandez, I. Katakis, y E. Dominguez, *Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis*. *Biosensors & Bioelectronics*, **1997**. 12(12): p. 1233-1243.
81. M. A. O. Amerine, C.S., *Analisis de vinos y mostos*, ed. E. Acribia. **1976**, Zaragoza.

82. M. A. del Cerro, G. Cayuela, A. J. Reviejo, J. M. Pingarron, y J. Wang, *Graphite-teflon-peroxidase composite electrodes. Application to the direct determination of glucose in musts and wines*. *Electroanalysis*, **1997**. 9(14): p. 1113-1119.
83. S. Miertus, J. Katrlík, A. Pizzariello, M. Stred'ansky, J. Svitel, y J. Svorc, *Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring*. *Biosensors & Bioelectronics*, **1998**. 13(7-8): p. 911-923.
84. J. Katrlík, J. Svorc, M. Stred'ansky, y S. Miertus, *Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix*. *Biosensors & Bioelectronics*, **1998**. 13(2): p. 181-191.

SEGUNDA PARTE, TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN.

---

---

III.- MICROELECTRÓNICA DE SILICIO: FABRICACIÓN DE  
MICROSENSORES.

---

---

### **III.- Objetivos.**

- ✓ Diseñar  $\mu$ transductores amperométricos con diferentes geometrías y relaciones de áreas entre los electrodos de trabajo y el auxiliar.
- ✓ Diseñar cada una de las máscaras necesarias para la fabricación de estos transductores, en función de las etapas requeridas en el proceso global.
- ✓ Fabricar mediante tecnología microelectrónica de silicio los dispositivos diseñados.
- ✓ Caracterizar utilizando métodos electroquímicos los microsensores fabricados.

## **III.1.- Introducción.**

La microfabricación se define como la fabricación de dispositivos en los que al menos una de sus dimensiones está en la escala de los micrómetros. Este proceso se basa en la deposición capa a capa de diferentes materiales sobre un sustrato, denominado oblea.

Silicio, vidrio y cerámica son los materiales más utilizados como sustrato para este tipo de fabricación [1]. Las propiedades eléctricas y mecánicas del silicio hacen de éste un material casi indispensable para la tecnología de capa delgada ("*thin film*") [2]. En general, las obleas utilizadas están compuestas por un monocristal de silicio y tienen un diámetro entre 100 y 300 mm. Se han desarrollado gran cantidad de técnicas basadas en la mecanización del silicio [3-5] y, en los últimos años, se ha investigado sobre polímeros capaces de actuar como sustratos [6-8], especialmente para aplicaciones biomédicas.

En los años 60 se pusieron a punto los primeros circuitos integrados fabricados con tecnología planar [9-11], y desde entonces este método ha sido ampliamente utilizado para la fabricación de dispositivos miniaturizados.

La aplicación de esta tecnología en la construcción de transductores electroquímicos es relativamente reciente. Durante los años 70 se desarrolló el primer transductor químico basado en tecnología de silicio, un transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) [12]. En los años 90, la investigación sobre sistemas miniaturizados de análisis ( $\mu$ TAS) hizo que se desarrollaran otro tipo de microsensores, tales como los potenciométricos y los amperométricos [1]. Desde entonces, la aplicación de la microfabricación al desarrollo de sensores químicos ha experimentado un gran crecimiento.

Las ventajas que presentan este tipo de dispositivos respecto a los electrodos convencionales son [13],

- Producción en masa con una buena reproducibilidad.
- Bajo coste.
- Posibilidad de realizar análisis en línea, in vivo e in vitro.
- Reducido tamaño, lo que implica bajo consumo de reactivos.

El proceso de fabricación se lleva a cabo en una instalación especial denominada sala blanca ("*clean room*"), que es básicamente un laboratorio en el que hay un control muy preciso de la temperatura, humedad, presión y calidad de aire. Mediante un filtrado continuo del aire se protege a los equipos y dispositivos fabricados de una posible contaminación por partículas. Existen diferentes clases de salas blancas en función del tamaño y el número de partículas presentes en el aire (Tabla III.1.1) [14]. Dentro de una misma sala blanca, pueden incluso definirse zonas de diferentes clases, en función del tipo de proceso que se realice en cada una.

**Tabla III.1.1:** Clasificación de las distintas clases de salas blancas en función de la concentración máxima permitida de partículas.

| Clase | partículas / m <sup>3</sup> |        |        |          |         |        |
|-------|-----------------------------|--------|--------|----------|---------|--------|
|       | 0.1 μm                      | 0.2 μm | 0.3 μm | 0.5 μm   | 1 μm    | 5 μm   |
| ISO 1 | 10                          | 2      |        |          |         |        |
| ISO 2 | 100                         | 24     | 10     | 4        |         |        |
| ISO 3 | 1000                        | 237    | 102    | 35       | 8       |        |
| ISO 4 | 10000                       | 2370   | 1020   | 352      | 83      |        |
| ISO 5 | 100000                      | 23700  | 10200  | 3520     | 832     | 29     |
| ISO 6 | 1000000                     | 237000 | 102000 | 35200    | 8320    | 293    |
| ISO 7 |                             |        |        | 352000   | 83200   | 2930   |
| ISO 8 |                             |        |        | 3520000  | 832000  | 29300  |
| ISO 9 |                             |        |        | 35200000 | 8320000 | 293000 |

## III.2.- Técnicas de fabricación microelectrónica.

Existen tres técnicas básicas de microfabricación de sensores químicos,

- Deposición y/o crecimiento.
- Fotolitografía.
- Grabado.

A continuación se describirán cada una de las técnicas, en base a los procesos empleados para la fabricación de transductores.

### **III.2.1.- Técnicas de deposición y crecimiento.**

En tecnología microelectrónica existen una gran variedad de técnicas y materiales (metales, semiconductores o dieléctricos) utilizados para la fabricación de dispositivos. La selección de una metodología específica para

obtener una capa fina de un mismo material depende de consideraciones [15] tales como,

- Características del material depositado.
- Aplicaciones del dispositivo.
- Procesos de fabricación.

### III.2.1.1.- Crecimiento térmico.

El crecimiento térmico es un proceso químico de formación de capas delgadas en el que el sustrato actúa de fuente del material depositado.

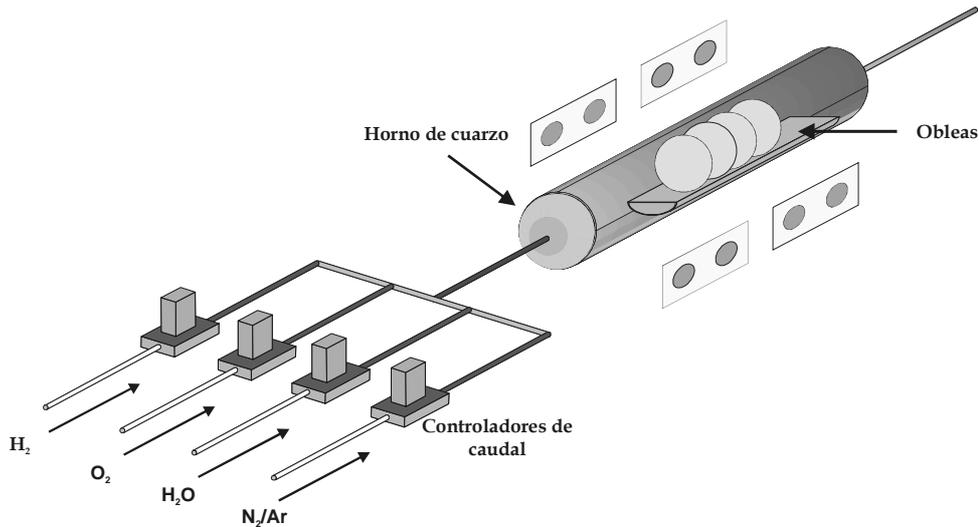
El más importante y estudiado de estos procesos es la oxidación de silicio, cuyo resultado es una capa de dióxido de silicio (dieléctrico) muy estable. Este óxido térmico crece al calentar una oblea de silicio entre 1000 °C y 1300 °C en presencia de una mezcla de gases que contiene oxígeno o agua. El agente oxidante difunde hasta entrar en contacto con la superficie de la oblea, donde reacciona con el silicio formando el óxido según alguna de las siguientes reacciones [16],



Otro proceso de crecimiento térmico para obtener una capa de un material dieléctrico es la formación de nitruro de silicio. Este proceso se lleva a cabo haciendo reaccionar al silicio con nitrógeno o amoníaco a temperaturas también elevadas (1000 °C - 1300 °C).

En ambos casos, la velocidad de crecimiento de las capas se regula mediante el control de la presión parcial de los gases precursores [17].

El equipo utilizado para los procesos térmicos (Fig. III.2.1) consiste en un horno tubular de cuarzo y un sistema de control de flujo de los gases reactivos. La temperatura ha de estar perfectamente controlada ( $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para asegurar un crecimiento uniforme de la capa.



**Figura III.2.1:** Esquema de un sistema de crecimiento térmico.

### III.2.1.2.- Procesos de deposición de materiales.

La deposición de materiales sobre la oblea se basa en la utilización de un material procedente de una fuente externa. La formación de capas delgadas se puede llevar a cabo en fase sólida, líquida o gaseosa, siendo ésta la más habitual, ya que puede ser utilizada para cubrir superficies irregulares, permitiendo un buen control de las propiedades de los materiales y facilitando el traslado del proceso a escala industrial.

La deposición de materiales en fase gaseosa se puede dividir en dos categorías principales, dependiendo de si implica o no una reacción química,

- Deposición física en fase gaseosa, “physical vapour deposition” (PVD).
- Deposición química en fase gaseosa, “chemical vapor deposition” (CVD).

#### *III.2.1.2.1.- Deposición física en fase gas (PVD).*

Este tipo de técnicas (Fig. II.2.2) se divide a su vez en dos clases, en función del tipo de energía utilizada para la evaporación del material a depositar.

- Evaporación térmica en vacío, en la que la energía necesaria para evaporar la muestra se suministra a través de una resistencia o un cañón de electrones.
- “*Sputtering*”, la muestra pasa a fase gas al ser bombardeada con iones.

#### **Evaporación térmica**

En el caso de la evaporación térmica, la muestra se calienta en una cámara de vacío y se transporta hasta el sustrato donde se produce la nucleación y el crecimiento progresivo de la capa fina. Los parámetros que afectan en mayor medida al crecimiento de la capa son,

- ✓ La presión en la cámara de vacío, que afecta a la contaminación de la capa formada. A una presión alrededor de  $10^{-6}$  Torr, existe una considerable cantidad de agua e hidrocarburos, mientras que a presiones de  $10^{-10}$  Torr la composición del aire presente en la cámara de vacío es principalmente hidrógeno y CO [16].

- ✓ El método de evaporación, para lo que existen dos posibilidades. Una de ellas consiste en calentar la muestra mediante una resistencia, lo que implica una elevada contaminación de la capa depositada [16]. El otro método consiste en bombardear el material a depositar, que está a un potencial muy negativo, con un cañón de electrones. Este método consigue reducir sustancialmente la contaminación de la capa [18].

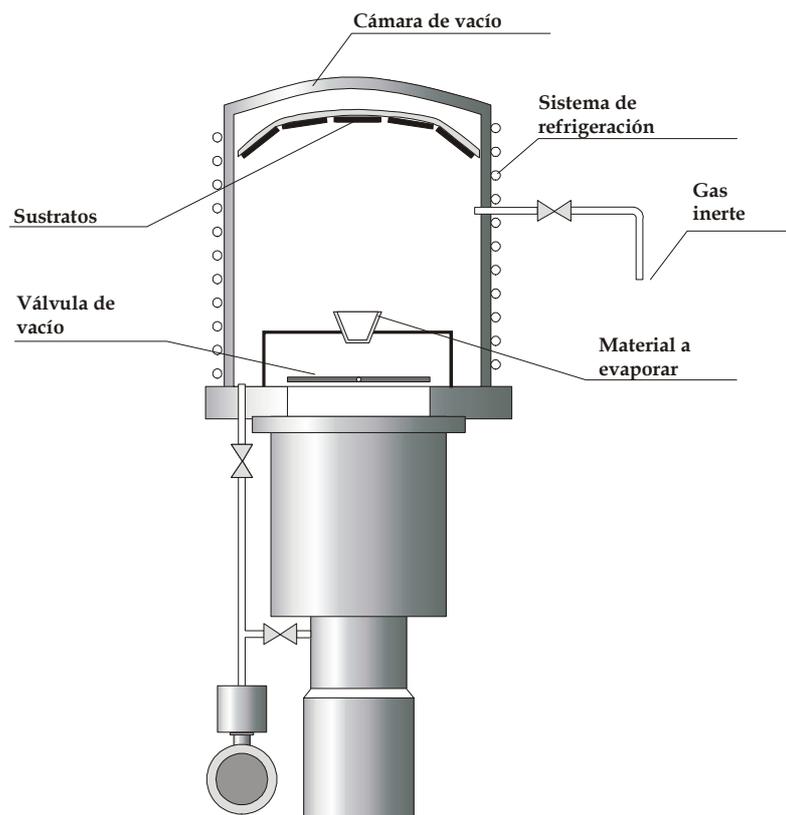


Figura III.2.2: Esquema de un sistema de evaporación térmica de vacío.

### *Sputtering*

En el proceso de *sputtering* (Fig. II.2.3), los átomos del material a depositar son extraídos mediante bombardeo con iones, generalmente de un gas inerte. Un diodo situado entre dos electrodos produce una descarga que ioniza el gas presente en la cámara, generando un plasma. Los iones son acelerados debido a la diferencia de potencial y golpean al cátodo, donde está

situado el material a depositar, liberando los átomos que se depositan seguidamente sobre el sustrato, situado en el ánodo [19].

Para conseguir suficientes iones y obtener velocidades de crecimiento rápidas, es necesario trabajar a presiones entre  $10^{-1}$  y  $10^{-4}$  Torr. Reduciendo la presión es posible reducir también la contaminación de la capa, y obtener así una deposición más uniforme y con mejor adhesión al sustrato [16].

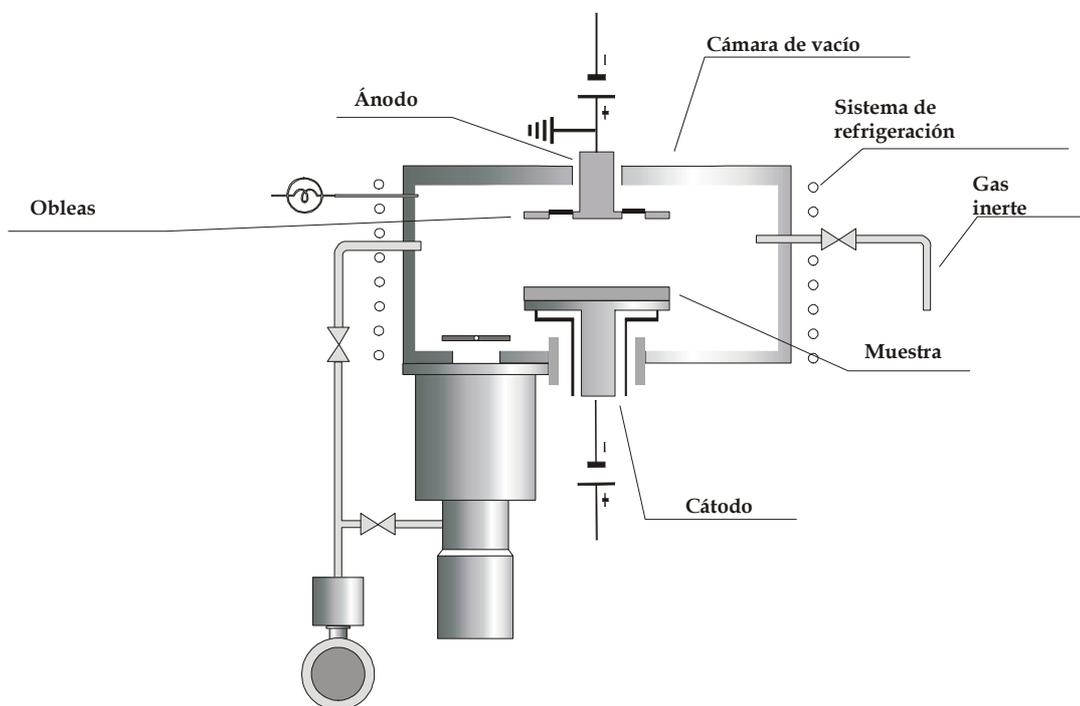


Figura III.2.3: Esquema de un sistema de sputtering.

#### III.2.1.2.2.- Deposición química en fase gas (CVD)

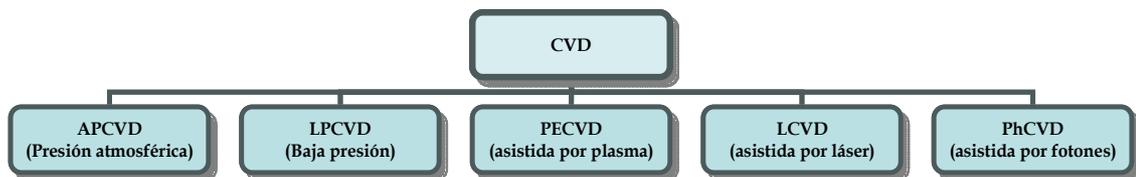
El crecimiento de la capa, en este caso, se produce debido a la reacción química entre diferentes especies en estado gaseoso. La reacción se lleva sobre el sustrato, o muy próxima a éste, bajo diferentes condiciones de presión y temperatura. Todos los productos, excepto el material depositado, han de ser volátiles en las condiciones de trabajo para asegurar la pureza de la capa.

La CVD es una técnica muy versátil y con importantes ventajas sobre otro tipo de procesos para depositar capas delgadas [16],

- ✓ Existen una gran variedad de precursores, por tanto es fácil obtener diferentes tipos de capas delgadas.
- ✓ Es posible depositar materiales que se descomponen utilizando otras técnicas.
- ✓ No requieren condiciones muy extremas de presión y temperatura.
- ✓ Se utilizan cristales de gran pureza, por tanto no incorpora un gran número de contaminantes en la capa formada.
- ✓ Permite la deposición de multicapas, con un gradiente de dopaje controlado.

Este tipo de técnicas requiere el empleo de equipos muy sofisticados, ya que existen gran cantidad de variables que regulan el proceso de deposición, y cuyo control es necesario para conseguir una capa de material de calidad.

Existen diferentes técnicas para la realización de este tipo de deposición, clasificándose en función de la presión de trabajo, o el método empleado para vaporizar reactivos de la reacción química (Fig. III.2.4).



**Figura III.2.4:** Clasificación de las diferentes técnicas para CVD.

La técnica más utilizada, especialmente en el campo industrial, es la que se realiza a baja presión, “*low pressure CVD*” (LPCVD), (0.1 - 1.0 Torr), ya que es capaz de reducir sustancialmente el coste de la producción.

Mediante los procesos en que se utiliza una energía no térmica (plasma, láser y fotones), se consigue trabajar a menores temperaturas y un mejor control de la velocidad de crecimiento de la capa, pero debido a la complejidad de las reacciones que se dan es difícil controlar la composición de ésta [20].

### III.2.2.- Fotolitografía.

En la fabricación de un dispositivo es necesario definir las zonas activas, como los diferentes electrodos o los contactos del sensor, sobre algunas de las capas de material depositado.

La fotolitografía es el proceso a través del cual estos motivos presentes en las diferentes máscaras son transferidos a la oblea. Una máscara es un vidrio, generalmente de cuarzo, en el que se han definido los motivos geométricos mediante una capa de cromo.

Generalmente, la complejidad de un proceso de fabricación se mide en función del número de máscaras necesarias para llevarlo a cabo. En la figura III.2.5 se muestran de manera esquemática los pasos a realizar durante un proceso fotolitográfico.

El primer paso del proceso consiste en la deposición sobre la oblea de un material que cambia su solubilidad al ser irradiado con luz ultravioleta, llamado fotoresina.

Una vez que ha sido irradiada, se sumerge en la solución adecuada para eliminar los restos de resina (revelado) y, de esta manera, transferir los motivos geométricos presentes en la máscara a la superficie de la oblea.

A continuación, las zonas no protegidas por la fotoresina son atacadas mediante alguno de los procesos de grabado descritos en la siguiente sección. Finalmente, la fotoresina restante es eliminada de la superficie de la oblea (decapado). Existen dos tipos de resinas fotosensibles según su reacción ante la luz UV (fig. III.2.4) [21],

- Fotoresina positiva, la zona donde incide la luz se hace soluble de tal manera que al eliminarla (revelado) queda definido el motivo.
- Fotoresina negativa, la parte irradiada polimeriza mientras que la zona no iluminada se elimina durante el revelado.

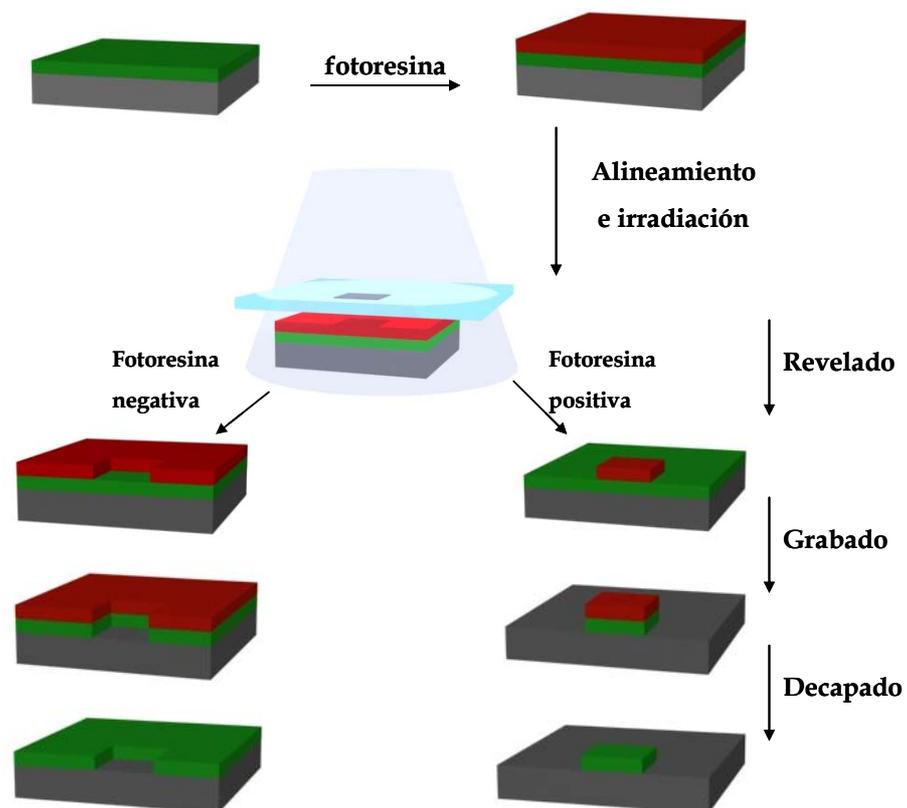


Figura III.2.5: Proceso fotolitográfico.

Las fotoresinas positivas tienen una mayor resolución que las negativas, si bien éstas son más sensibles y su adhesión al sustrato es mucho mejor [16].

La resolución de la fotolitografía viene dada por las características del sistema óptico utilizado. Los fenómenos de difracción y la creación de ondas estacionarias son los que crean las mayores limitaciones en esta técnica.

Debido a la difracción generada cuando la oblea es irradiada, la luz incide sobre zonas de la resina que no deberían ser iluminadas.

El fenómeno de las ondas estacionarias es producido por las interferencias constructivas y destructivas generadas en el interior de la fotoresina. La luz atraviesa la resina y es reflejada en la superficie del sustrato. Los fotones atraviesan otra vez la resina, y parte de éstos son reflejados de nuevo en la interfase resina-aire [16]. Este proceso se repite reiteradamente provocando que ciertas zonas de la fotoresina reciban más intensidad que otras.

Estos dos fenómenos ópticos provocan que las dimensiones de los motivos traspassados a la oblea sean ligeramente diferentes a los de la máscara [22].

### **III.2.3.- Grabado.**

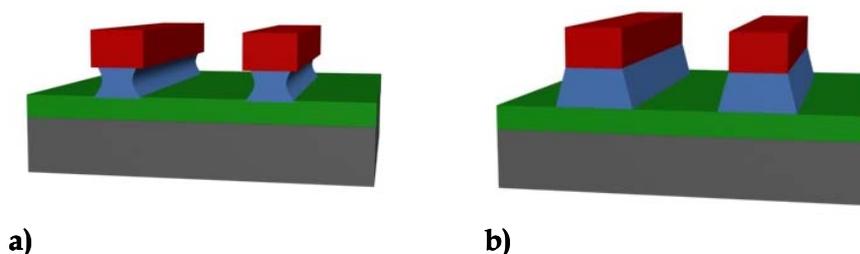
El grabado es el método a través del cual quedan definidas las estructuras de los dispositivos, que previamente han sido traspassadas de la máscara a la oblea utilizando técnicas de fotolitografía. La fotoresina depositada sobre la oblea actúa de protección en las zonas donde es necesario

mantener el material depositado, siendo el resto eliminado mediante alguna de las técnicas de grabado que se describen a continuación,

### Grabado húmedo.

El grabado húmedo, o grabado químico, se lleva a cabo eliminando la zona del material depositado no protegido por la resina sumergiendo la oblea en una solución con la composición adecuada. Este grabado, generalmente, implica una reacción redox, de tal manera que mediante oxidación o reducción de la capa fina se provoca su disolución [23]. Este grabado puede ser a su vez de dos tipos,

- Isotrópico, la velocidad de ataque es igual en todas las direcciones (Fig. III.2.6 a).
- Anisotrópico, el ataque se realiza a mayor velocidad en una de las direcciones (Fig. III.2.6 b).



**Figura III.2.6:** Esquema de ataques isotrópico (a) y anisotrópico (b).

Generalmente, el grabado húmedo es isotrópico, por lo que los motivos tienen un área inferior a la esperada. Sólo en los casos en que el material grabado sea un monocristal se puede conseguir, utilizando las soluciones adecuadas, un grabado anisotrópico.

Esta técnica se utiliza para realizar grabados de motivos de dimensiones superiores a tres micras. Esta limitación es debida a la tensión superficial producida en los casos de dimensiones inferiores, que impide que la solución entre en contacto con el material a grabar. Este efecto se agrava cuanto más gruesa es la capa a atacar [16].

### **Grabado seco.**

El grabado seco comprende una serie de métodos para atacar el material que forma la capa, realizados en fase gaseosa [24],

- Físicamente, mediante un bombardeo de iones generados en un plasma que, al colisionar con la superficie eliminan el material convirtiéndolo en una fase gaseosa.
- Químicamente, mediante reactivos en fase gaseosa que forman productos volátiles al reaccionar con el material a grabar.
- Combinando los dos mecanismos anteriores.

El ataque químico, seleccionando el gas adecuado, puede tener una gran selectividad en el grabado, a diferencia del físico. La ventaja del grabado físico reside en que el ataque es totalmente anisotrópico, permitiendo formar estructuras con paredes perfectamente verticales [16].

Uno de los métodos de grabado seco más utilizado es el grabado por iones reactivos o RIE (*“Reactive Ion Etching”*) (Fig. II.2.7). Se basa en un mecanismo de ataque físico-químico, que combina las ventajas de ambos tipos de procesos. El plasma utilizado para grabar la superficie atacada contiene radicales libres de átomos o moléculas que reaccionan con el material de la capa, eliminándolo [16].

Esta técnica se utiliza principalmente para atacar capas de óxido o nitruro de silicio. Al reaccionar el grupo silicio de estos compuestos con radicales libres de cloro o flúor se forman compuestos volátiles [25].

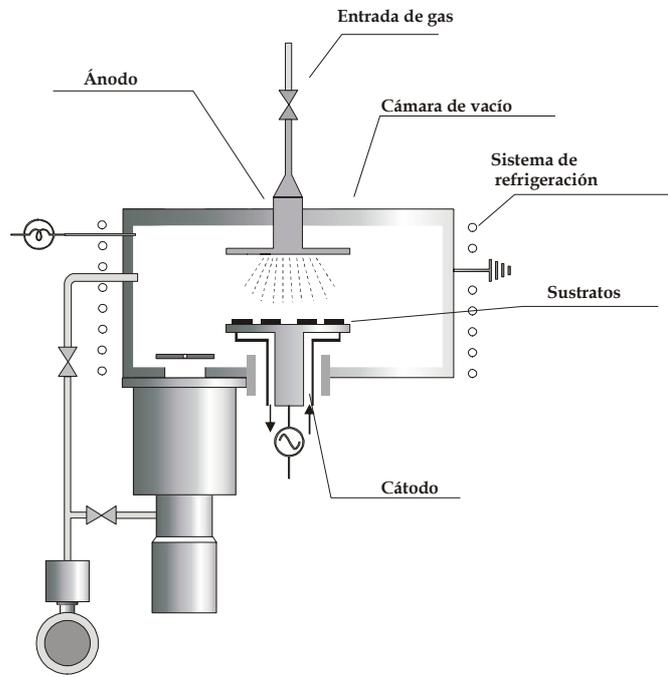


Figura III.2.7: Esquema general de un equipo de RIE.

### Grabado indirecto o "Lift-off"

Existen materiales, como platino, en los que es difícil realizar el grabado de los motivos diseñados mediante las técnicas descritas anteriormente. En estos casos se recurre a un tipo de procesos llamados "lift off".

Este proceso, como se puede ver en la figura III.2.8, consta de tres etapas básicas [26],

- Sobre el sustrato se deposita una fotoresina positiva que, mediante técnicas fotolitográficas, definirá las geometrías necesarias para la fabricación de los dispositivos.
- Se deposita sobre toda la superficie de la oblea el material (metal o dieléctrico) que formará la capa fina.
- Por último la oblea se sumerge en un baño de un disolvente, generalmente acetona, capaz de eliminar la fotoresina y con ella el metal depositado sobre ésta.

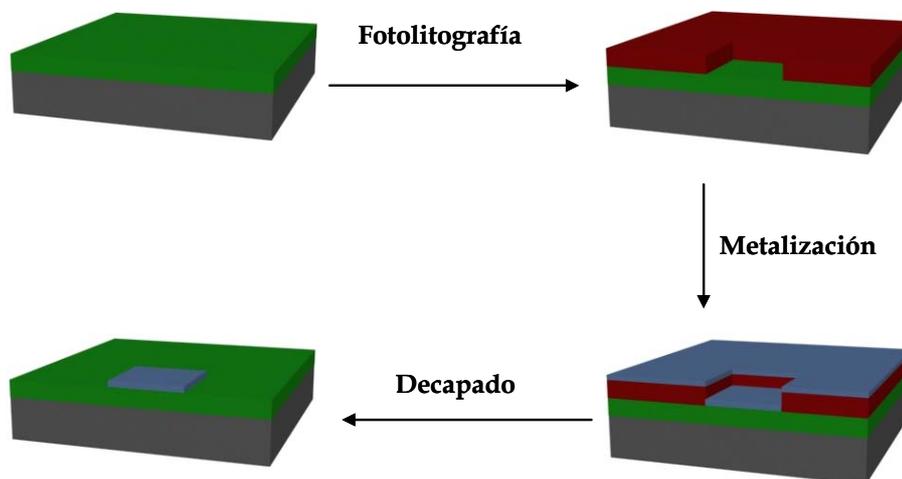


Figura III.2.8: Esquema del proceso de "lift off".

### III.3.- Reactivos, equipos y software.

El proceso de fabricación se llevó a cabo en las instalaciones de la sala blanca del centro nacional de microelectrónica (Barcelona, España). Las máscaras necesarias para la fabricación de los dispositivos fueron diseñadas

mediante el software Lasi 6.3.2.4 y fabricadas por Photronics, Inc. (Manchester, Reino Unido).

Los reactivos utilizados para la caracterización de los transductores fueron de grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (18 M $\Omega$ cm).

Las disoluciones de ferricianuro potásico (Merck, Darmstadt, Alemania) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de éste en una solución 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl (Panreac, Barcelona, Spain).

Las medidas se realizaron utilizando un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie BV, Utrecht, Holanda). Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System (GPES) [27].

Todas las medidas electroquímicas se realizaron frente a un electrodo de referencia Ag/AgCl 3 mol dm<sup>-3</sup> (Crison, Barcelona, España).

### **III.4.- Diseño y fabricación de los $\mu$ transductores.**

#### **III.4.1.- Diseño de los $\mu$ transductores.**

Una de las etapas más importantes en la fabricación de dispositivos es su diseño, que no sólo consiste en definir el área y la distribución de los

electrodos sino que también implica el diseño de cada una de las máscaras o niveles de fabricación necesarios. Ha de tenerse en cuenta el tipo de fotoresina que se utilizará y el proceso que se llevará a cabo una vez la resina haya sido irradiada y revelada.

Se diseñaron dos tipos de  $\mu$ transductores amperométricos, ambos con unas dimensiones de 3 x 3 mm, consistentes en tres electrodos de platino. Dos de ellos forman los electrodos auxiliar y de trabajo. El tercero actuará como electrodo de referencia, aunque debido a su complejidad e importancia para la realización de las medidas electroquímicas, diversas aproximaciones en su fabricación y caracterización se describirán individualmente en el capítulo V de esta memoria.

El primer diseño se definió con una geometría rectangular (Fig. III.4.1.a). Consiste en 4 electrodos, uno central que actuará como referencia, dos rectángulos laterales que formarán los electrodos de trabajo y por último, un contraelectrodo situado alrededor de éstos.

La geometría del segundo diseño (Fig. III.4.1.b) es circular. El electrodo de trabajo es una circunferencia situada en el centro con un radio de 0.4 mm, alrededor de la cual se sitúa el contraelectrodo. El electrodo de referencia se definió a partir del rectángulo de platino situado a la derecha del dispositivo.

En la parte inferior de ambos diseños pueden observarse los contactos de los sensores, que se fabricaron en oro para facilitar la posterior soldadura de los chips a los circuitos impresos ("*printed circuit board*", PCB).

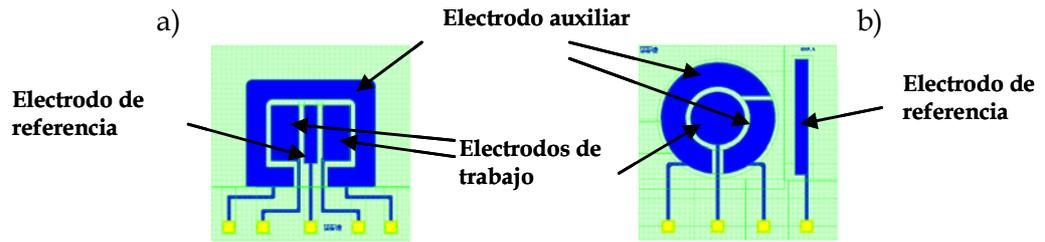


Figura III.4.1: Esquema de los transductores diseñados.

La relación de áreas entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo es un parámetro significativo en sus prestaciones electroquímicas. Así, los diseños propuestos cuentan bien con un electrodo de trabajo o con un contraelectrodo cuya área activa puede ser modificada, permitiendo así obtener distintas relaciones de dicho parámetro en función de las necesidades del análisis propuesto.

En la tabla III.4.1 se muestran las áreas teóricas de los electrodos que forman los transductores diseñados. En diseño A, el electrodo de trabajo permite trabajar con dos áreas geométricas distintas y en el caso del diseño B, es el contraelectrodo el que cuenta con tres áreas posibles, dependiendo de si se trabaja con cada una de las subunidades o se cortocircuitan.

Tabla III.4.1: Áreas teóricas de cada uno de los electrodos.  $A_w$ : área del electrodo de trabajo,  $A_c$ : área del contraelectrodo y  $A_r$  área del electrodo de referencia.

|       | Diseño A                                | Diseño B                                                    |
|-------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| $A_w$ | $0.32 \text{ mm}^2 / 0.64 \text{ mm}^2$ | $0,50 \text{ mm}^2$                                         |
| $A_c$ | $1.56 \text{ mm}^2$                     | $0,85 \text{ mm}^2 / 0,51 \text{ mm}^2 / 1,36 \text{ mm}^2$ |
| $A_r$ | $0.06 \text{ mm}^2$                     | $0,35 \text{ mm}^2$                                         |

El proceso de fabricación de estos dispositivos conlleva tres niveles fotolitográficos, por tanto se diseñaron tres máscaras diferentes,

- Una primera máscara para definir la geometría de los electrodos y las vías de platino.
- La segunda máscara define la forma y posición del oro depositado para definir los contactos.
- La tercera, define el grabado de la capa de pasivante depositada al final del proceso de fabricación, para delimitar el área electrónica útil.

### III.4.2.- Fabricación de los $\mu$ transductores.

Una vez diseñadas y fabricadas las máscaras necesarias para los procesos fotolitográficos, se llevó a cabo la fabricación de los microsensores utilizando los procesos habituales en fabricación microelectrónica, descritos en la sección III.2. Cabe destacar que cada uno de los diseños se llevó a cabo en dos procesos de fabricación ("*runs*") diferentes.

El sustrato sobre el cual se realizó todo el proceso es una oblea de silicio de 4" de diámetro (10 mm), tipo n (dopada con fósforo de 1-12  $\Omega$ cm). Sobre esta oblea, perfectamente limpia, se depositó una capa de 1  $\mu$ m de óxido de silicio mediante el proceso de oxidación térmica descrito en la sección III.2.1.1 (Fig. III.4.2 a). Esta capa de material dieléctrico es necesaria para aislar los electrodos de la oblea de silicio, evitando así que se cortocircuiten.

La siguiente etapa consiste en la formación de los electrodos de platino. Debido a la dificultad que conlleva realizar un grabado directo sobre este metal [16], esta etapa se realizó mediante un proceso de grabado indirecto o "*lift off*" (sección III.2.3).

Inicialmente se depositó una fotoresina sobre la oblea, que fue cubierta con la máscara adecuada para este paso, e irradiada con luz UV (Fig. III.4.2 b). Al revelar la fotoresina no curada, quedan definidos en la oblea los motivos correspondientes a los electrodos. A continuación, se depositó mediante un cañón de electrones (sección III.2.1.2.1) una capa de 20 nm de titanio para mejorar la adhesión del platino sobre el óxido de silicio y a continuación, 150 nm de platino (Fig. III.4.2.c). Posteriormente la oblea se sumergió en acetona, eliminando la fotoresina endurecida y el platino depositado sobre ella, definiéndose así la estructura final de los electrodos de platino (Fig. III.4.2.d).

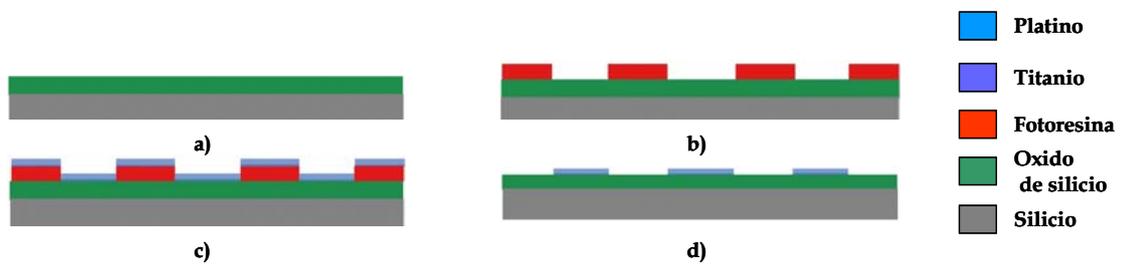


Figura III.4.2: Esquema del proceso de "lift off".

El siguiente paso fue la formación de los contactos de oro. Esto se realizó depositando una tricapa de metales, titanio (50 nm) níquel (50 nm) y oro (150 nm) (Fig. III.4.3.a) mediante "sputtering" (sección III.2.1.2.1). Titanio y níquel son necesarios para mejorar la adhesión de la capa de oro sobre el platino.

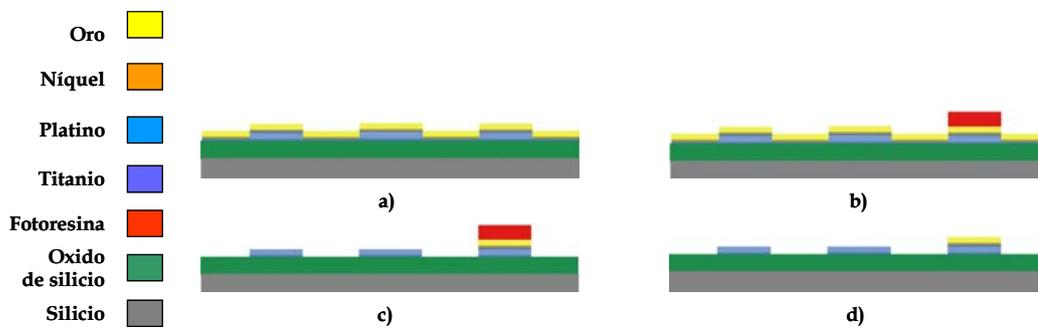
Una vez depositados los metales y protegidas, mediante fotolitografía, las zonas donde quedarán finalmente definidos los contactos de oro (Fig. III.4.3.b), se atacaron químicamente, uno a uno, los tres metales con las soluciones adecuadas (Fig. III.4.3.c),

- yodo / yoduro, para el oro.
- ácido nítrico / agua (1:4), en el caso del níquel.

- propilenglicol / ácido fluorhídrico / agua, para el titanio.

En estos ataques es importante controlar el tiempo de inmersión, ya que es un grabado de tipo isotrópico y por tanto en el caso de exceder el tiempo adecuado, el metal protegido por la resina también sería atacado.

Una vez eliminados los metales de las zonas no protegidas por la resina, se procedió al decapado de ésta, utilizando acetona (Fig III.4.3.d).

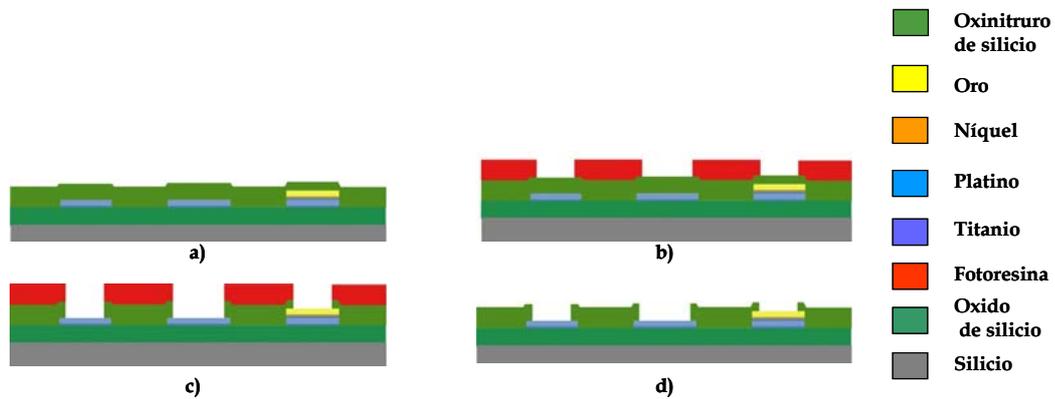


**Figura III.4.3:** Esquema del proceso de grabado de oro.

Para delimitar la superficie útil se depositó sobre la oblea una capa de material pasivante o dieléctrico. Se depositó una capa de  $1\mu\text{m}$  de oxinitruro de silicio (Fig. III.4.4.a) mediante la técnica de deposición química en fase vapor asistida por plasma (PECVD), haciendo reaccionar  $\text{SH}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$  en fase vapor sobre la superficie de la oblea (sección III.2.1.2.2).

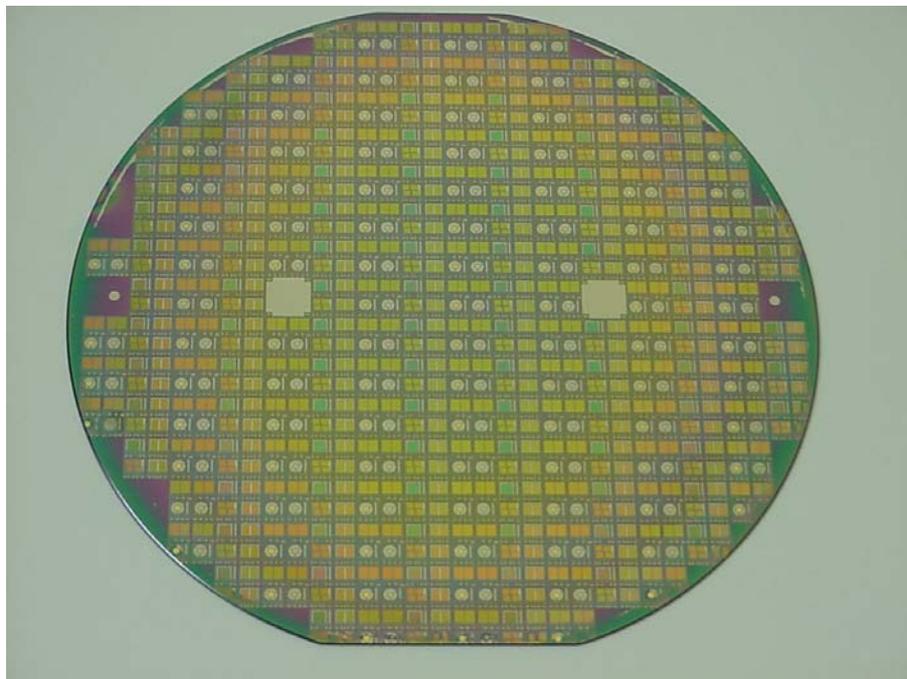
Para eliminar el pasivado de la superficie electrónica activa, se utilizó una fotoresina que protegió las áreas donde la capa de pasivante se debía mantener (Fig. III.4.4.b).

Posteriormente, el oxinitruro se eliminó mediante un grabado por iones reactivos (RIE) (Fig. III.4.4.c). Finalmente, se realizó el decapado de la resina restante, sumergiendo la oblea en acetona (Fig. III.4.4.d).

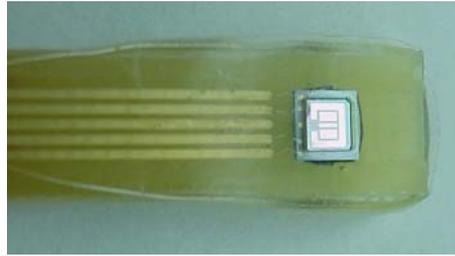


**Figura III.4.4:** Esquema del proceso de grabado del oxinitruro de silicio.

Una vez acabado el proceso de fabricación, la oblea (Fig. III.4.5) fue cortada con el fin de individualizar los sensores que fueron soldados sobre tiras de PCB y encapsulados con Ebecryl (Fig. III.4.6), un polímero fotocurable utilizado para aislar las conexiones entre el sensor y la solución.



**Figura III.4.5:** Imagen de una oblea una vez acabado el proceso de fabricación.



**Figura III.4.6:** *Microtransductor individualizado y soldado sobre un sustrato de PCB.*

### **III.5.- Caracterización de los $\mu$ transductores.**

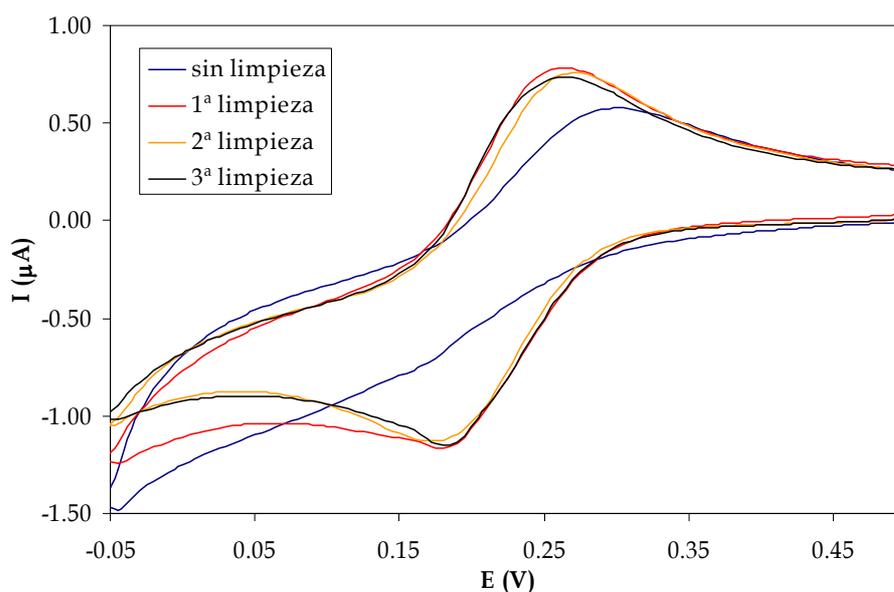
La operatividad y funcionalidad de los transductores desarrollados se caracterizó electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica utilizando ferricianuro potásico [28,29]. Las propiedades redox de este analito son perfectamente conocidas sobre electrodos convencionales, lo que permite su utilización como sonda electroquímica al compararlas con las registradas mediante los transductores diseñados.

Generalmente, los procesos térmicos a que han sido sometidos este tipo de microtransductores generan una fina capa de óxido sobre la superficie del metal, provocado así su pasivación y, por tanto, una disminución de su área activa [30].

En la figura III.5.1. se muestra un voltamperograma cíclico de una solución  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  de ferricianuro en  $0.1$  mol  $\text{dm}^{-3}$  de KCl. Puede observarse un voltamperograma distorsionado, con una separación de picos de oxidación y reducción superior a la teórica (59 mV) [31], que confirma la mencionada pasivación.

Por tanto, se realizó una activación electroquímica de los distintos dispositivos. Se registraron 20 voltamperogramas cíclicos, en una solución  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl, entre  $-1.2$  y  $-2.2 \text{ V}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , en los que se observa la evolución de hidrógeno sobre la superficie del electrodo de trabajo. El hecho de generar un gas tan reactivo como éste sobre la superficie del electrodo permite la eliminación de sustancias pasivantes depositadas sobre el mismo.

Al realizar nuevamente un voltamperograma en ferricianuro bajo las condiciones descritas anteriormente, se aprecia una sustancial mejora (Fig. III.5.1). Este proceso se repitió hasta que no se observó una mejora apreciable en el voltamperograma de ferrocianuro registrado.



**Figura III.5.1:** Voltamperogramas cíclicos en una solución  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  de ferricianuro potásico. Velocidad de barrido,  $100 \text{ mV/s}$ . Cada uno de estos voltamperogramas ha sido registrado después de realizar una limpieza electroquímica.

Una vez activado el electrodo de trabajo, se procedió a su caracterización mediante voltamperometría cíclica, ya que es una técnica versátil y de fácil manejo, utilizando ferricianuro.

Con el fin de comprobar el buen funcionamiento de los electrodos, se calculó la desviación entre la intensidad obtenida experimentalmente y la intensidad teórica calculada según la ecuación de Randles-Sevcik [32],

$$I_p = \psi nFA[c] \sqrt{\frac{nFD}{RT}} \nu \quad (3.1)$$

donde,

$I_p$  = intensidad de pico

$n$  = número de electrones

$R$  = número de Faraday

$A$  = área del electrodo

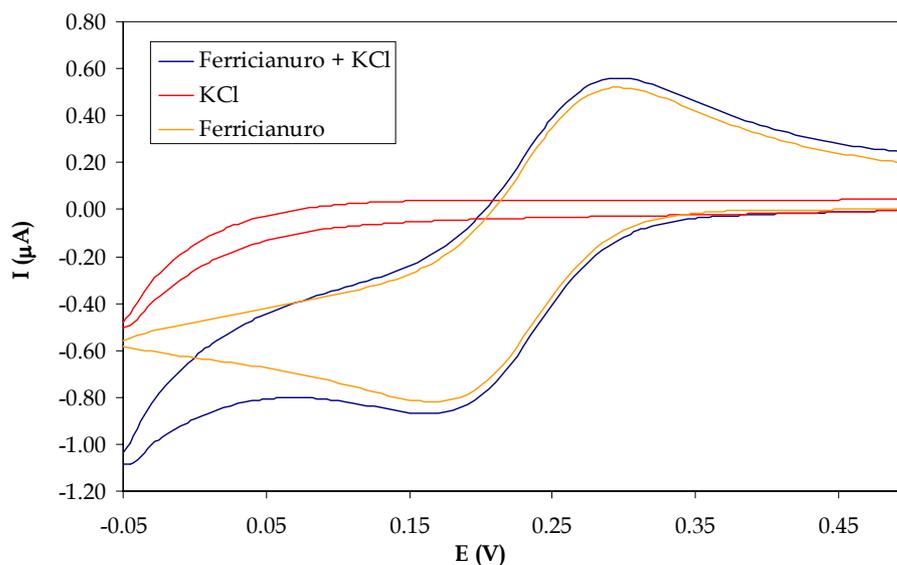
$[c]$  = concentración de ferricianuro

$D$  = coeficiente de difusión del ferricianuro

$R$  = 8,314 J/Kmol

$T$  = temperatura = 298 K

El cálculo experimental de la intensidad se realizó registrando un voltamperograma cíclico entre 0.5 V y - 0.05 V en presencia de una solución 1 mmol dm<sup>-3</sup> de ferricianuro disuelto en una solución 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl, a una velocidad de barrido de 100 mV s<sup>-1</sup>. Para obtener el valor real de la intensidad de pico se restó la corriente de fondo, para lo que se registró un voltamperograma cíclico en las mismas condiciones de una solución de 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl. Al restar dichos voltamperogramas, se obtiene el potencial de los picos de reducción y de oxidación del ferricianuro, así como su intensidad (Fig. III.5.2).



**Figura III.5.2:** Voltamperogramas cíclicos de una disolución de ferricianuro  $1\text{mmol dm}^{-3}$  en  $0.1\text{ mol dm}^{-3}$  de KCl, registrados utilizando los transductores de geometría circular desarrollados. Velocidad de barrido,  $100\text{ mV s}^{-1}$ .

En la tabla III.5.1 se muestran los resultados obtenidos para la intensidad de pico experimental, la teórica, la desviación entre ambas y la separación entre los picos de oxidación y reducción de distintos transductores amperométricos correspondientes a los dos diseños propuestos.

**Tabla III.5.1:** Resultados obtenidos en la caracterización de los diferentes sensores fabricados.  $\Delta E_p$ : Diferencia de potencial entre picos de oxidación y reducción.  $I_p^{\text{red}}$ , Intensidad experimental del pico de reducción.  $I_p^{\text{teor}}$ , Intensidad de pico teórica.

|          | Transductor | $\Delta E_p / \text{V}$ | $I_p^{\text{red}} / \mu\text{A}$ | $I_p^{\text{teor}} / \mu\text{A}$ | desviación $I_p^{\text{exp}} / I_p^{\text{teor}}$ |
|----------|-------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| Diseño A | 2141_6      | 0.08                    | 1.13                             | 0.974                             | 16.03%                                            |
|          | 2141_15     | 0.08                    | 1.04                             | 0.974                             | 6.79%                                             |
|          | 2141_16     | 0.08                    | 0.66                             | 0.974                             | -32.02%                                           |
| Diseño B | 2440_29     | 0.08                    | 1.09                             | 1.08                              | 1.04%                                             |
|          | 2440_31     | 0.095                   | 1.07                             | 1.06                              | 0.93%                                             |
|          | 2440_37     | 0.095                   | 1.10                             | 1.06                              | 3.76%                                             |
|          | 2440_38     | 0.085                   | 1.08                             | 1.07                              | 0.51%                                             |

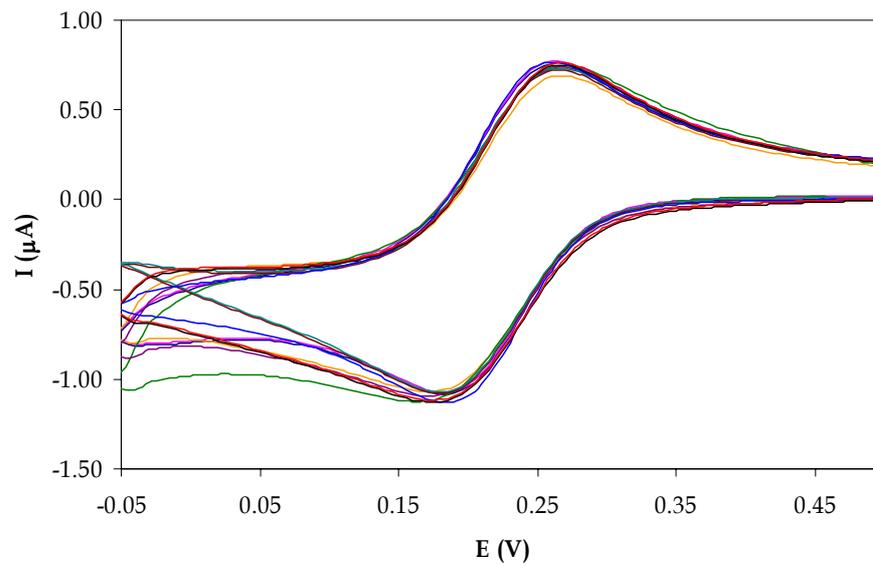
Como puede observarse en la tabla anterior fueron los sensores basados en un diseño circular del electrodo de trabajo (diseño B) los que muestran menos desviación entre la intensidad teórica y la experimental.

Los valores de desviación significativamente elevados que muestran los dispositivos de platino de geometría rectangular (diseño A), pueden atribuirse a problemas tecnológicos que surgieron durante el procesado, en la definición de la capa de pasivación. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la correcta definición y realización de los diferentes procesos tecnológicos implicados en la fabricación de los chips.

En ambos casos, la separación entre los picos de oxidación y reducción fue aproximadamente de 80 mV, no lejanos de los 59 mV teóricos para un sistema redox basado en ferricianuro. Esto indica la correcta transferencia electrónica asociada a estos dispositivos.

Por último, se comprobó la reproducibilidad de los dispositivos con diseño circular. Se registraron diversos voltamperogramas cíclicos de una disolución 1 mmol dm<sup>-3</sup> de ferricianuro, a 100 mV s<sup>-1</sup> (Fig. III.5.3), con distintos chips. La desviación estándar residual (RSD) de la intensidad del pico de reducción fue de 1.19% (n = 10,  $\alpha = 0.05$ ), lo que pone de manifiesto las óptimas características de estos dispositivos para su utilización como sensores químicos.

De hecho, en las aplicaciones que se describirán en los últimos capítulos de la presente tesis, han sido este tipo de transductores los utilizados en el desarrollo de biosensores para la determinación de diferentes analitos.



**Figura III.5.3:** Voltamperogramas cíclicos registrados utilizando transductores contruidos conforme al diseño B. Concentración de ferricianuro,  $1\text{mmol dm}^{-3}$ . Velocidad de barrido,  $100\text{ mV s}^{-1}$ .

### III.- Bibliografía.

1. H. Suzuki, *Advances in the microfabrication of electrochemical sensors and systems*. ELECTROANALYSIS, **2000**. 12(9): p. 703-715.
2. A. Hierlemann, O. Brand, C. Hagleitner, y H. Baltes, *Microfabrication techniques for chemical/biosensors*. Proceedings of the Ieee, **2003**. 91(6): p. 839-863.
3. W. M. Menz, J.; Paul, O., *Microsystems Technology*, ed. Wiley-VCH. **2001**, New York.
4. G. T. A. Kovacs, *Micromachined Transducers Sourcebook*, ed. McGraw-Hill. **1998**, New York.
5. J. Voldman, M. L. Gray, y M. A. Schmidt, *Microfabrication in biology and medicine*. Annual Review of Biomedical Engineering, **1999**. 1: p. 401-425.
6. D. S. Lee, H. Yang, K. H. Chung, y H. B. Pyo, *Wafer-scale fabrication of polymer-based microdevices via injection molding and photolithographic micropatterning protocols*. Analytical Chemistry, **2005**. 77(16): p. 5414-5420.
7. J. S. Ko, H. C. Yoon, H. S. Yang, H. B. Pyo, K. H. Chung, S. J. Kim, y Y. T. Kim, *A polymer-based microfluidic device for immunosensing biochips*. Lab on a Chip, **2003**. 3(2): p. 106-113.
8. H. Beckery C. Gartner, *Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications*. Electrophoresis, **2000**. 21(1): p. 12-26.
9. G. W. A. Dummer, *Microminiaturization by Thin Film and Solid Circuit Techniques*. British Journal of Applied Physics, **1962**. 13(8): p. 384-&.
10. J. S. Kilby, *Invention of Integrated-Circuit*. Ieee Transactions on Electron Devices, **1976**. 23(7): p. 648-654.
11. R. N. Noyce, *Microelectronics*. Scientific American, **1977**. 237(3): p. 63-69.
12. M. J. M. Madou, S.R., *Chemical Sensing with Solid State Devices*, ed. I. Academic Press. **1989**, Londres: Harcourt Brace Jovanovich.

13. Z. Q. Zhu, J. Zhang, y J. Z. Zhu, *An overview of Si-based biosensors*. *Sensor Letters*, **2005**. 3(2): p. 71-88.
14. W. Whyte, *Cleanroom Technology: Fundamentals of Design, Testing and Operation*. **2001**, New York: John Wiley and Sons, Inc.
15. W. S. Kern, K., *Deposition Technologies and Applications: Introduction and Overview*, in *Handbook of Thin-Film Deposition Processes and Techniques - Principles, Methods Equipment and Applications*, K. Seshan, Editor. **2002**, William Andrew Publishing. p. 11-45.
16. M. Madou, *Fundamentals of microfabrication*, ed. M. Madou. **2002**, Boca Raton, Florida: Gottehrer, Paul.
17. R. B. Fair, *Diffusion and oxidation of silicon*, in *Microelectronics Processing: Chemical Engineering Aspects*, D.W.J. Hess, K.F., Editor. **1989**, American Chemical Society: Washington. p. 265-323.
18. K. Reichelty X. Jiang, *The Preparation of Thin-Films by Physical Vapor-Deposition Methods*. *Thin Solid Films*, **1990**. 191(1): p. 91-126.
19. P. R. Willmott, *Deposition of complex multielemental thin films*. *Progress in Surface Science*, **2004**. 76(6-8): p. 163-217.
20. J. Foggiato, *Chemical Vapor Deposition of silicon dioxide films*, in *Handbook of Thin-Film Deposition Processes and Techniques - Principles, Methods Equipment and Applications*, K. Seshan, Editor. **2002**, William Andrew Publishing. p. 11-45.
21. McGillis, *Lithography*, ed. V. Technology. **1983**: McGraw-Hill.
22. W. M. Moreau, *Semiconductor lithography: principles, practices and materials.*, ed. c. Plenum Press. **1988**, New York.
23. D. Zhuangy J. H. Edgar, *Wet etching of GaN, AlN, and SiC: a review*. *Materials Science & Engineering R-Reports*, **2005**. 48(1): p. 1-46.
24. S. J. Peartony D. R. Norton, *Dry etching of electronic oxides, polymers, and semiconductors*. *Plasma Processes and Polymers*, **2005**. 2(1): p. 16-37.
25. P. H. Yih, V. Saxena, y A. J. Steckl, *A review of SiC reactive ion etching in fluorinated plasmas*. *Physica Status Solidi B-Basic Research*, **1997**. 202(1): p. 605-642.
26. G. C. Fiaccabrinoy M. Koudelka-Hep, *Thin-film microfabrication of electrochemical transducers*. *Electroanalysis*, **1998**. 10(4): p. 217-222.

27. GPES, *General Purpose Electrochemical System for Windows*, 4.9. **ver. 4.9**, EcoChemie B.V.: Utrech, Holanda 2002
28. S. H. Lee, H. Y. Fang, y W. C. Chen, *Electrochemical characterization of screen-printed carbon electrodes by modification with chitosan oligomers*. *Electroanalysis*, **2005**. 17(23): p. 2170-2174.
29. G. S. Reedery W. R. Heineman, *Electrochemical characterization of a microfabricated thick-film carbon sensor for trace determination of lead*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **1998**. 52(1-2): p. 58-64.
30. M. A. Alonso Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, y F. J. Muñoz Pascual, *Biosensor based on platinum chips for glucose determination*. *Analytica Chimica Acta*, **2005**. 547(2): p. 209-214.
31. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. **2001**, New York: John Wiley and Sons, Inc.
32. M. S. Chao, *J. Electrochem. Soc.*, **1968**. 115: p. 1172.
33. E. Crouch, D. C. Cowell, S. Hoskins, R. W. Pittson, y J. P. Hart, *Amperometric, screen-printed, glucose biosensor for analysis of human plasma samples using a biocomposite water-based carbon ink incorporating glucose oxidase*. *Analytical Biochemistry*, **2005**. 347(1): p. 17-23.

#### IV.- TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE ELECTRODOS SERIGRÁFICOS.

## IV.- Objetivos.

- ✓ Diseñar transductores amperométricos con diferentes geometrías.
- ✓ Diseñar cada una de las pantallas necesarias para la fabricación de estos transductores.
- ✓ Fabricar mediante técnicas serigráficas los dispositivos diseñados utilizando diferentes sustratos y tintas.
- ✓ Caracterizar utilizando métodos electroquímicos los microsensores fabricados.

## **IV.1.-Introducción.**

La tecnología de capa gruesa ("*thick film*") consiste en la deposición de diversas capas de materiales conductores y dieléctricos, con el fin de construir sensores planos de estado sólido. Existen diferentes técnicas de fabricación basadas en esta tecnología, aunque la más utilizada es la serigráfica ("*screen-printing*"). Ésta se presenta como una excelente alternativa a la de capa delgada ("*thin film*") ya que permite construir sensores químicos con buena reproducibilidad y una infraestructura mínima [1].

La serigrafía es un método de impresión directa, también llamado de impresión por penetración. Consiste en la deposición de tintas capa a capa sobre un sustrato mediante el empleo de una pantalla o tamiz, de tal manera que las tintas pasan a través de las zonas no obturadas de ésta, quedando impresas sobre el sustrato y definiendo así la geometría del sensor.

La calidad de los sensores químicos fabricados con tecnología serigráfica depende, en gran medida, de los materiales utilizados (tintas y sustratos) y del tipo de pantalla [2]. Por tanto, estos aspectos deben ser cuidadosamente considerados durante el diseño de los dispositivos.

A continuación se describen brevemente los materiales necesarios para el desarrollo de esta tecnología.

#### IV.1.1.- Pantallas.

La pantalla o matriz, en la que se dibuja previamente el original que se ha de imprimir, se compone de un tamiz especialmente fino y tensado en un marco, generalmente de aluminio (Fig. IV.1.1). Las mallas que abarca el dibujo se dejan libres, mientras las restantes se obturan o ciegan con una disolución de cola [3].

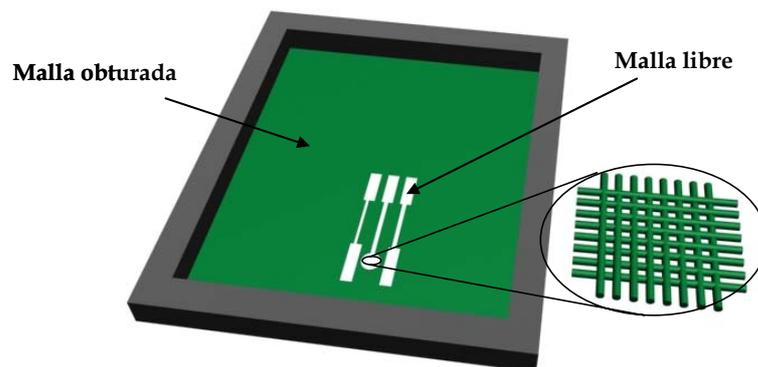


Figura IV.1.1. Pantalla serigráfica.

Una pantalla debe ser fácil y rápida de confeccionar, poseer una buena definición, durabilidad para grandes tiradas, resistente a las tintas y ser fácil de borrar o de desemulsionar en caso de requerirlo [4].

La pantalla o matriz se puede obtener de diferentes formas [4],

- Por fotograbado. Con este método se obtiene una óptima definición de la imagen al copiar, mediante un proceso fotoquímico, una

imagen desde una película o transparencia a una malla emulsionada. Es este el sistema de mayor precisión, rapidez y el de más amplia utilización en la actualidad, ya que permite reproducir líneas muy finas.

- Por obturación de las mallas con pincel, fijación de ocultadores o tiras recortadas y pegadas sobre la trama, impresión de una capa de gelatina mediante copia fotomecánica, etc.

Entre las características que definen una pantalla, cabe destacar el tamaño, el material y la densidad de los hilos que la forman, así como la tensión de éstos [3].

La selección de un mallado adecuado es de gran importancia para la fabricación, ya que de éste depende la cantidad de tinta que se imprime, y por tanto, el grosor de la capa depositada [3]. Los factores que influyen en la selección de este parámetro son tanto la resolución que se necesita en los dispositivos como el tipo de tinta a utilizar.

El área no obturada de la malla depende del número de filamentos y de su diámetro. Así, a un diámetro y número de hilos pequeño le corresponde un área relativamente grande y por tanto, un elevado volumen de tinta depositada.

El tejido que se solía utilizar para su fabricación en el pasado era de seda o gasa [5] (sericum en latín, término del que procede el nombre de serigrafía). Actualmente las pantallas suelen ser de [3],

- Poliéster. Es el más utilizado, puesto que tiene una buena elasticidad, resistencia, tiempo de vida largo y ofrece poca resistencia al movimiento de la paleta o rasqueta encargada de aplicar la tinta.

- Nylon. Es el más elástico de todos, y es muy utilizado para depositar tintas en superficies no planas. Esta elevada elasticidad hace que se deforme con facilidad, transmitiendo estas deformaciones a los dispositivos.
- Mallas metálicas muy finas. La mayor ventaja que presenta el acero inoxidable es su alta resolución, lo que permite formar motivos de tamaños muy reducidos.

#### IV.1.2.- Sustratos.

El sustrato es el material sobre el que se imprimen las tintas. Tradicionalmente no se ha prestado mucha atención a estos materiales, si bien en los últimos 30 años se han desarrollado muchos estudios sobre nuevos materiales para esta aplicación [6]. Las características de éste dependen de las tintas utilizadas, el proceso de fabricación y la aplicación final del dispositivo.

En el caso de dispositivos para aplicaciones electroquímicas, las características de estos sustratos son [6],

- ✓ alta constante dieléctrica, con el fin de evitar el cortocircuito entre los electrodos.
- ✓ buena adhesión con las tintas depositadas.
- ✓ bajo coeficiente de expansión térmica, para no deformarse durante el proceso de curado de las tintas.
- ✓ compuesto por un material inerte.

Se suelen utilizar materiales que consisten en cerámicas, como alúmina, y en los últimos años está siendo bastante común la utilización de plásticos, como polivinilcarbonato (PVC), policarbonato, poliéster o fibra de vidrio.

### IV.1.3.- Pastas y tintas.

Las tintas o pastas son formulaciones utilizadas para construir los electrodos serigráficos. Existen una gran variedad de ellas, según la función que tengan que desarrollar. Suelen estar formadas por un elemento aglutinante, generalmente vidrios pulverizados o resinas [7], en los que son disueltos los aditivos que infieren las propiedades particulares de cada tinta. En el caso de tintas de baja de resistividad eléctrica, estos materiales suelen ser grafito, o metales como oro, plata o platino. Para formular tintas aislantes, se suelen utilizar silicatos u óxidos metálicos.

Las propiedades más destacables en las tintas serigráficas son [8],

- ✓ Viscosidad. Tiene que ser adecuada al proceso de fabricación. Depende de la naturaleza del aglutinante y del porcentaje de aditivos.
- ✓ Adherencia, necesaria para asegurar una buena fijación de las tintas en el sustrato.
- ✓ Flexibilidad. Evita la presencia de roturas en la superficie del electrodo. Es especialmente importante en el caso de sustratos flexibles.
- ✓ Resistividad eléctrica, definida, principalmente, por el tipo de aditivo.

Existe una gran variedad de tintas comerciales con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas. Posteriormente, pueden ser modificadas con mediadores o elementos de reconocimiento, para adaptarlas al proceso de fabricación o a la aplicación del dispositivo [9]. También es frecuente desarrollar formulaciones específicas en los laboratorios [9-11].

Estas tintas requieren normalmente un proceso térmico final, en el que son curadas, o endurecidas. La temperatura de curado depende del material aglutinante, pudiendo llegar a alcanzar los 1000 °C. Existen tintas, basadas en resinas, que curan a temperaturas menores, entre 80 °C y 150 °C. Cabe destacar el desarrollo de tintas fotocurables, derivado principalmente de la aplicación de la tecnología serigráfica a procesos fotolitográficos [12].

## **IV.2.- Reactivos, equipos y software.**

Los transductores amperométricos fueron fabricados con un equipo serigráfico DEK 248 (DEK, Reino Unido).

Las tintas utilizadas fueron obtenidas en Acheson Colloids Company (Port Huron, USA). Se depositaron sobre dos tipos de sustratos, poliéster, facilitado por Teinser (Barbera del Valles, España), y fibra de vidrio.

Las pantallas de 23''x 23'', necesarias para la fabricación de los dispositivos, fabricadas con monofilamentos de poliéster, Poly 90-230 emulsión 18 micras, fueron diseñadas mediante el programa Lasi 6.3.2.4 y fabricadas por Asflex Internacional (Madrid, España).

Todos los reactivos utilizados en la caracterización de los transductores fueron de grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (18 MΩ cm). Las disoluciones de ferricianuro potásico (Merck, Darmstadt, Alemania) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de éste en una solución 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl (Panreac, Barcelona, España).

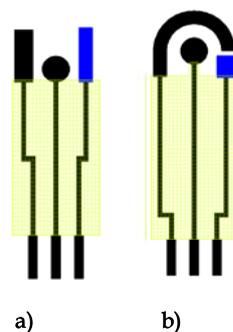
Las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie BV, Holanda). Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System GPES [13].

## IV.3.- Diseño y fabricación de los dispositivos.

### IV.3.1.- Diseño de los dispositivos.

Se diseñaron dos tipos de transductores amperométricos mediante tecnología serigráfica, basados en una configuración integrada de tres electrodos. Dos de los electrodos, trabajo y auxiliar, fueron construidos en grafito y el tercero, electrodo de referencia, por tinta de plata/cloruro de plata.

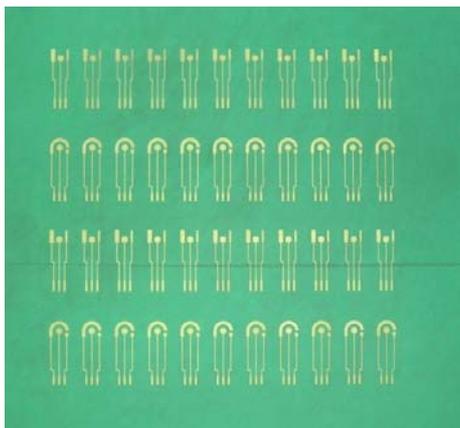
En ambos casos, el electrodo de trabajo consistió en un círculo de 3 mm de diámetro. Los diseños se diferencian por la forma y el tamaño del electrodo auxiliar. En uno de los casos tiene una forma rectangular, situado a un lado del electrodo de trabajo (Fig. IV.3.1 a) y en el otro consiste en un arco que envuelve al electrodo de trabajo (Fig. IV.3.1 b).



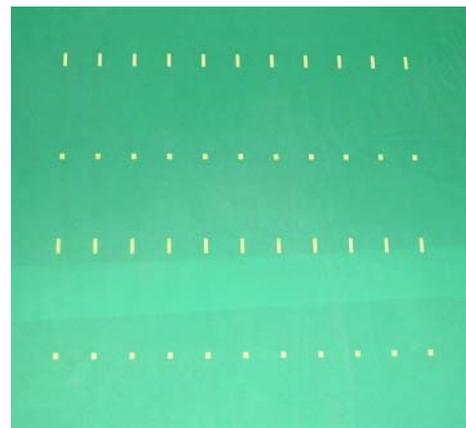
**Figura IV.3.1:** Diseños realizados para la fabricación de chips serigráficos.

Se diseñaron tres pantallas diferentes para la fabricación de estos dispositivos, correspondientes a cada nivel de deposición de tintas,

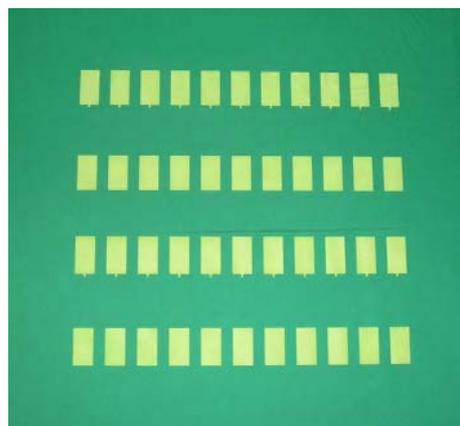
- ✓ Una primera pantalla para la formación de los electrodos de trabajo y auxiliar (Fig. IV.3.2.a).
- ✓ Una segunda malla que define la forma y posición del electrodo de referencia (Fig. IV.3.2.b).
- ✓ Y la última pantalla correspondiente a la deposición de encapsulante (Fig. IV.3.2.c).



a)



b)



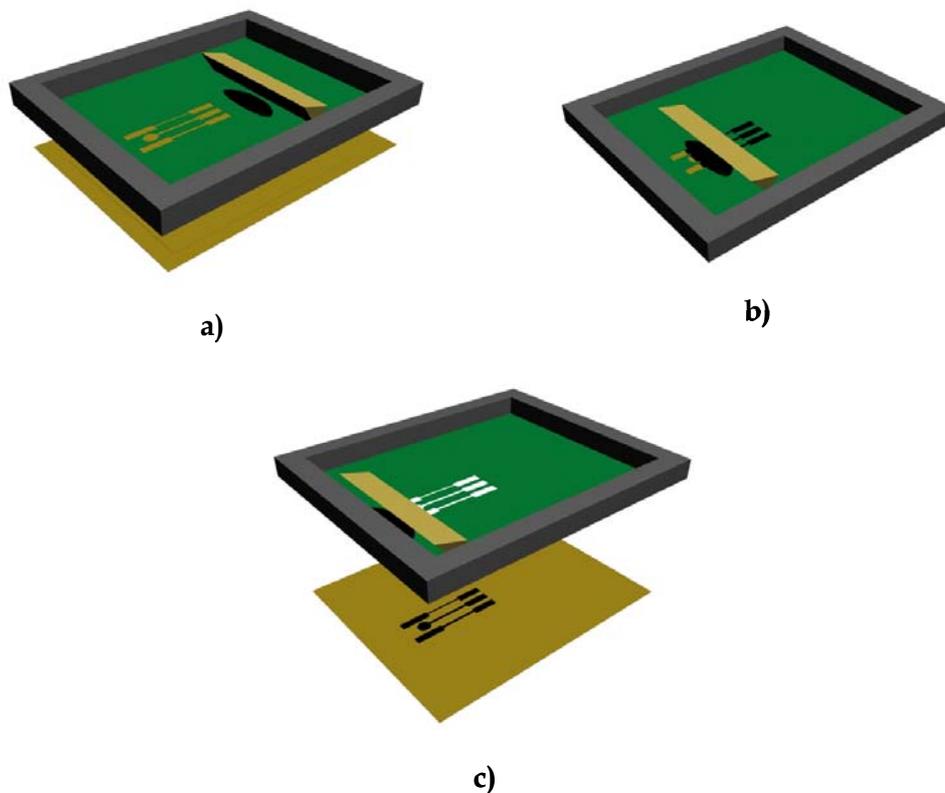
c)

**Figura IV.3.2:** Fotografías de las pantallas utilizadas. a) Deposición de grafito, b) Deposición de Ag/AgCl y c) Deposición del encapsulante.

### IV.3.2.- Fabricación de los dispositivos.

El proceso de construcción por serigrafía implica, básicamente, cinco etapas consistentes en la deposición secuencial de las diferentes tintas y sus posteriores curados.

La primera etapa fue la deposición de la tinta de grafito (Electrodag 407A) sobre un sustrato de fibra de vidrio o de poliéster, limpiado previamente con etanol. De esta manera se definieron los electrodos auxiliar y de trabajo, así como las vías conductoras (Fig IV.3.3.). Una vez llevada a cabo la impresión, fue necesario esperar 24h para que se evaporaran a temperatura ambiente los solventes de la tinta de grafito.

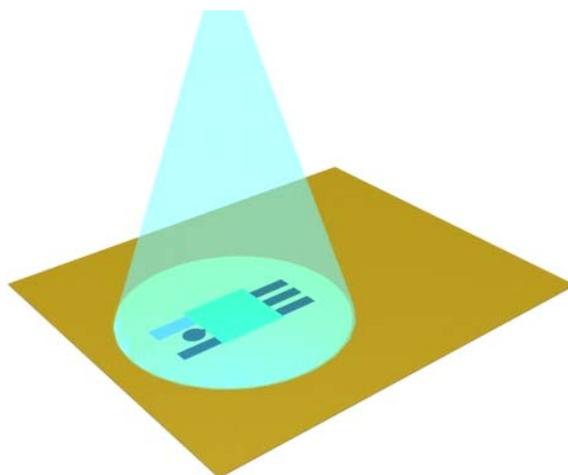


**Figura IV.3.3:** Esquema del proceso de deposición de la tinta de grafito.

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, y utilizando la pantalla adecuada, se procedió a la deposición de una tinta formada por Ag/AgCl (Electrodag 6037 SS) para definir el electrodo de referencia. En este caso fueron necesarias dos deposiciones para garantizar un grosor adecuado y así, su buen funcionamiento como electrodo de referencia.

La siguiente etapa es el curado de estas tintas. Esto se realizó mediante un ciclo térmico, 80 °C durante 30 minutos seguido de 120 °C durante 5 minutos más. Es importante destacar que este proceso debe hacerse de manera gradual para reducir las tensiones que pudieran provocarse por cambios bruscos de temperatura en las capas depositadas.

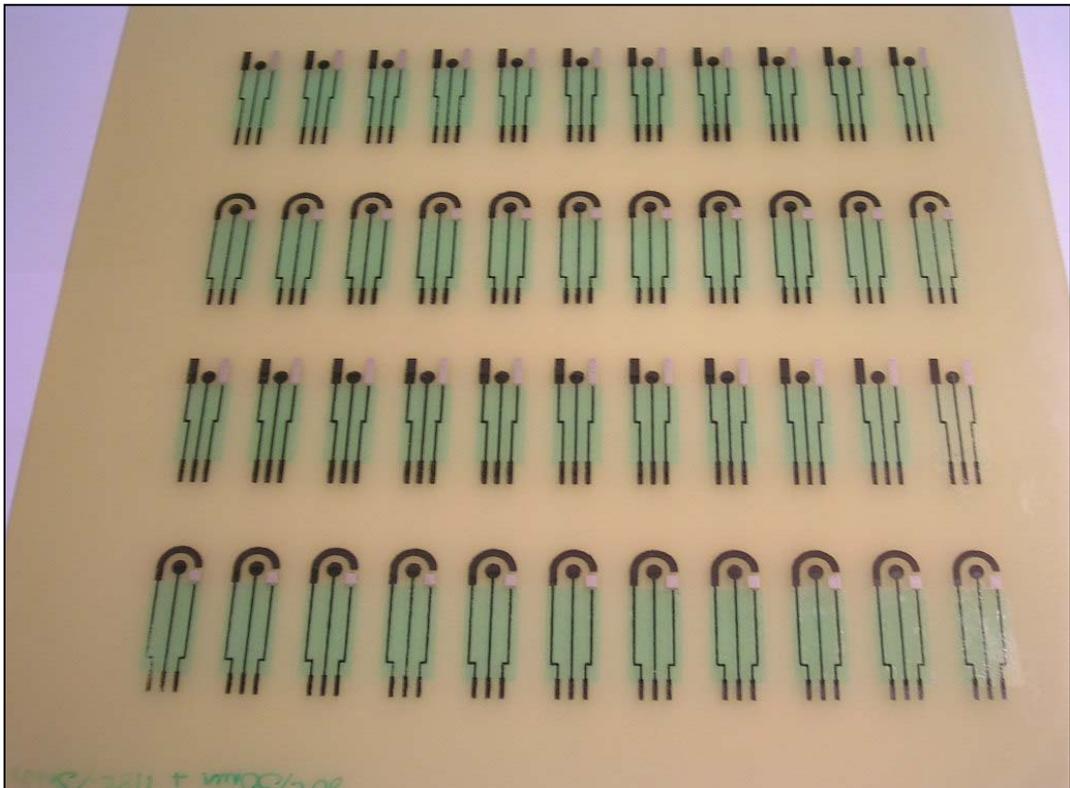
La última etapa consistió en la deposición y endurecimiento del encapsulante (Electrodag 452 SS), encargado de aislar las vías de la solución electrolítica. En este caso, una vez depositado el aislante utilizando la pantalla fabricada para este fin, se irradió con luz ultravioleta para endurecerlo, ya que la tinta era fotocurable (Fig. IV.3.4).



**Figura IV.3.4:** Esquema del proceso de endurecimiento del encapsulante.

Fue necesario cubrir el sustrato con una lámina de poliéster transparente (Mylar®) durante su polimerización, evitando el contacto con oxígeno e impidiendo así que reaccionara con los radicales formados en la tinta durante el proceso de polimerización y provocara un endurecimiento defectuoso.

Una vez finalizado el proceso de fabricación (Fig. IV.3.5) los transductores fueron individualizados y se procedió a su caracterización.



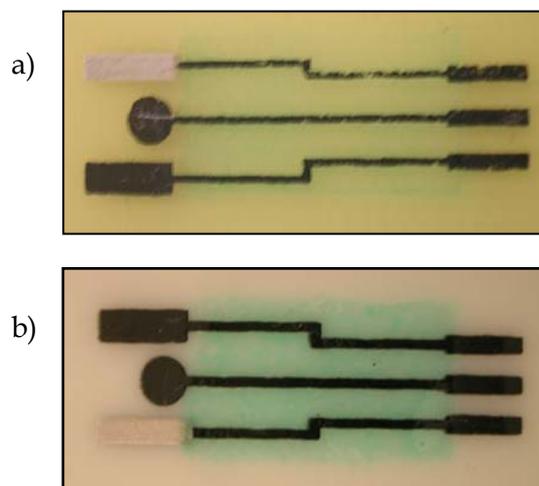
**Figura IV.3.5:** Imagen de un lote de transductores una vez finalizado el proceso de fabricación.

## IV.4.- Caracterización de los dispositivos.

Como ya se ha comentado anteriormente, en la fabricación de los electrodos serigráficos se trabajó con soportes de poliéster y de fibra de vidrio.

Se analizó inicialmente la adhesión de las tintas en dichos substratos mediante el método Scotch [14, 15]. Consiste, básicamente, en colocar un trozo de cinta adhesiva sobre la superficie del dispositivo y tirar, verificando así si las tintas se desprenden o se mantienen.

Como se puede ver en la figura IV.4.1, la adhesión sobre el poliéster (Fig. IV.4.1.b) es mucho mejor que sobre la fibra de vidrio (Fig. IV.4.1.a). En el primer caso al retirar la cinta adhesiva, el encapsulante y las vías de grafito se desprendieron parcialmente.

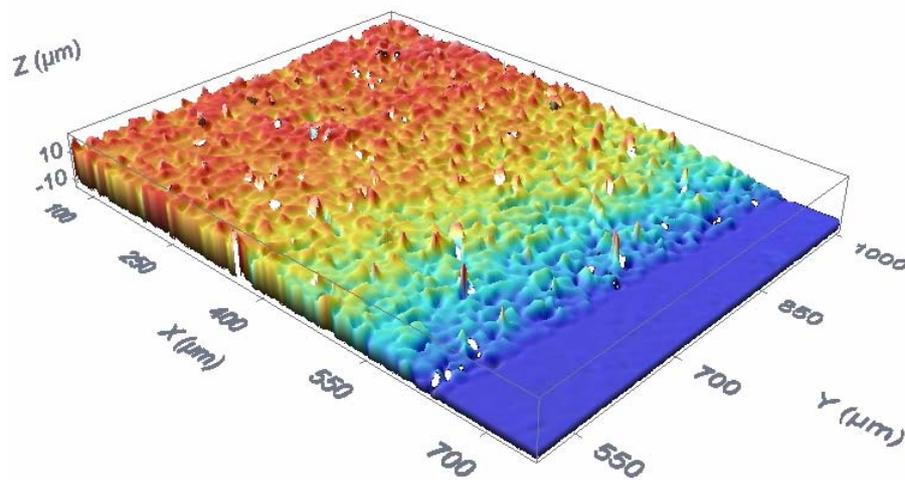


**Figura IV.4.1:** Resultados del método Scotch para comprobar la adhesión. (a) fibra de vidrio. (b) poliéster.

Por lo tanto, todo el trabajo que se describirá a continuación fue realizado con dispositivos fabricados sobre un soporte de poliéster.

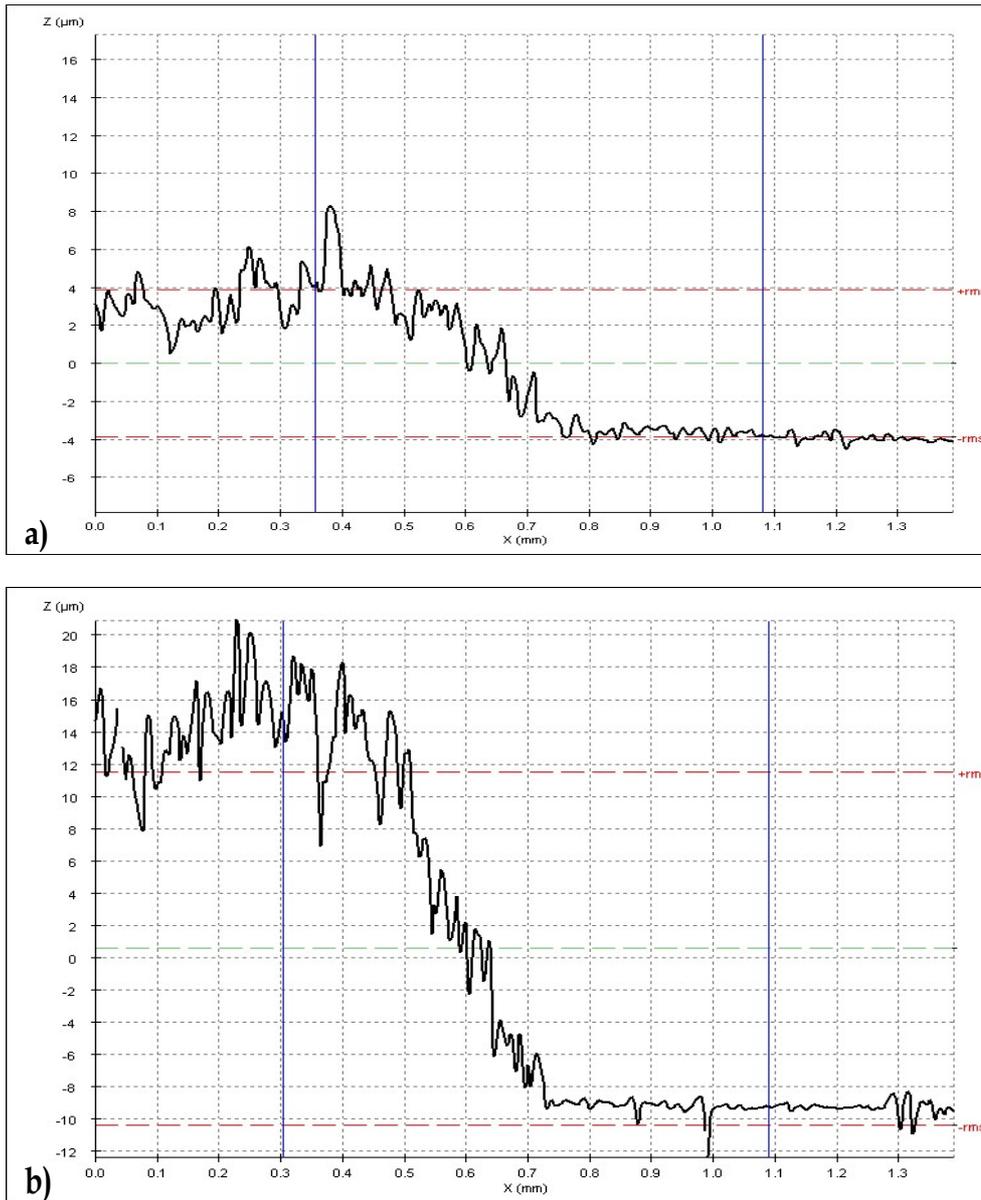
### IV.4.1.- Perfilometría.

Para la caracterización de los dispositivos desarrollados, se realizó inicialmente un estudio de la superficie de los electrodos, mediante un microscopio confocal, determinando el grosor y la rugosidad de las diferentes tintas depositadas. Esta técnica permite realizar un barrido de imágenes a diferentes alturas, extrapolar una visión tridimensional de la superficie (Fig. IV.4.2).



**Figura IV.4.2:** Imagen, realizada mediante microscopía confocal, de un electrodo de referencia en el chip serigráfico.

En la figura IV.4.3 se muestran los perfiles de un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia.



**Figura IV.4.3:** Perfiles de la capa de grafito que define el electrodo de trabajo (a) y el electrodo de referencia (b).

El grosor medio obtenido en la deposición de grafito fue de  $7.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  ( $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y la rugosidad de  $1.17 \pm 0.09 \mu\text{m}$  ( $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ ). En el caso de la tinta de Ag/AgCl, el grosor fue de  $22.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$  ( $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y la rugosidad,  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$  ( $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

El mayor grosor que se observa en el caso de la capa de Ag/AgCl se debe, evidentemente, a la superposición de las dos capas de esta tinta sobre la base de grafito definida en la primera etapa.

#### IV.4.2.- Caracterización electroquímica.

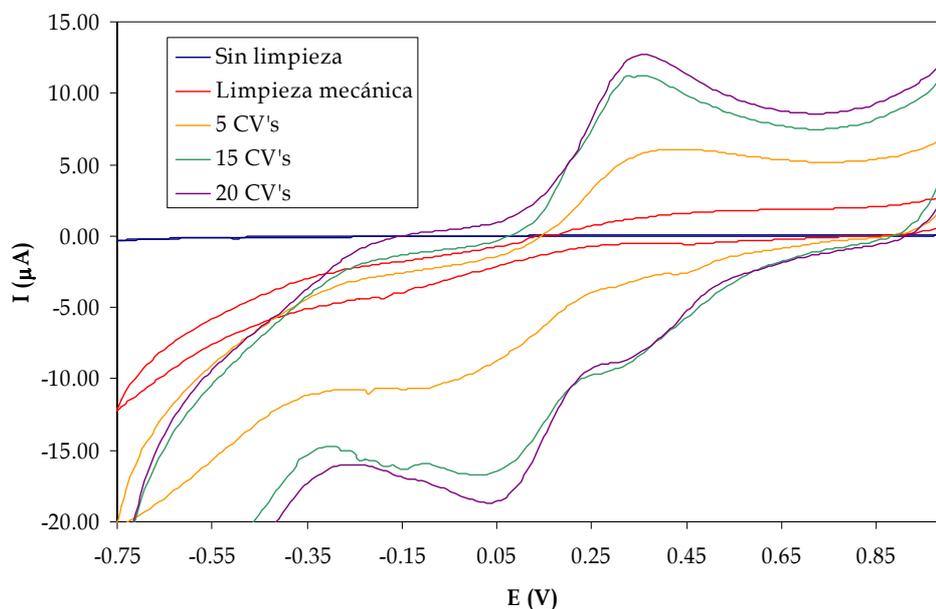
Previo a la caracterización electroquímica fue necesario realizar una activación de la superficie de los electrodos. Esto puede deberse a que el grafito es un material muy adsorbente y durante el proceso de fabricación es posible que se contamine con sustancias no conductoras o bien, que durante los procesos de evaporación y curado de las tintas, las partículas de grafito, por efecto de la gravedad, se desplacen a la parte inferior del electrodo dejando en la parte superior gran cantidad del material aglutinante que lo pasiva.

Esta activación se realizó mediante dos procesos,

- Inicialmente se realizó un pulido mecánico de los electrodos, auxiliar y de trabajo, con una lija de grano fino.
- Seguidamente se llevó a cabo una activación electroquímica. Con este fin, se sumergió el dispositivo en una solución  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl y se registraron 20 voltamperogramas cíclicos entre  $-2.5 \text{ V}$  y  $2.5 \text{ V}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para comprobar la efectividad de la activación, se registró un voltamperograma cíclico entre  $1$  y  $-0.75 \text{ V}$  en una solución  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  de ferricianuro disuelto en KCl  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Como se observa en la figura IV.4.4, a medida que se realizan voltamperogramas cíclicos la intensidad de pico del ferricianuro aumenta, lo que confirma la activación de la superficie del electrodo.



**Figura IV.4.4:** Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  de ferricianuro durante el proceso de activación de los dispositivos. Velocidad de barrido,  $100 \text{ mV s}^{-1}$

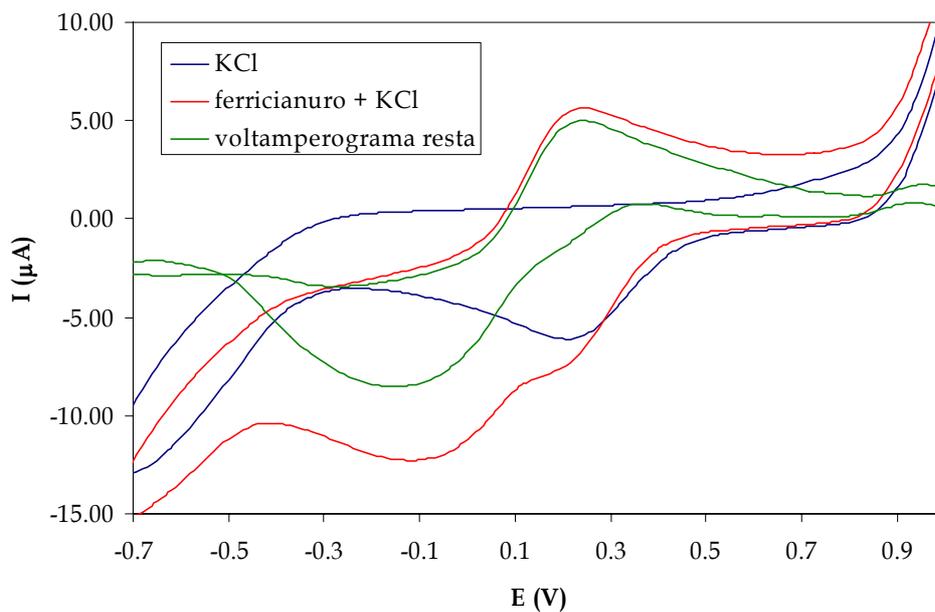
Una vez comprobado el correcto funcionamiento del sensor, se procedió a su caracterización electroquímica, de acuerdo con el procedimiento descrito para los chips de platino fabricados mediante técnicas fotolitográficas descritos en el capítulo anterior.

Inicialmente, se registró un voltamperograma cíclico en una solución  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  de ferricianuro en  $\text{KCl } 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Para obtener la intensidad de pico experimental, es necesario restar la corriente debida al cloruro potásico presente en la solución, por tanto se realizó un voltamperograma cíclico en las mismas condiciones de velocidad y entre los mismos potenciales en una solución que sólo contenía  $\text{KCl } 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Restando los voltamperogramas con y sin ferricianuro en presencia de KCl, se obtiene el valor de la intensidad debida exclusivamente a la oxidación y reducción del ferricianuro, así como los valores de potencial redox (Fig. IV.4.5).

La intensidad de pico obtenida se comparó con la intensidad teórica calculada según la ecuación de Randles-Sevcik [16], tal y como se explica en el capítulo anterior,

$$I_p = \psi nFA[c] \sqrt{\frac{nFD}{RT}} \nu \quad (4.1)$$



**Figura IV.4.5:** Voltamperogramas cíclicos utilizados para obtener los potenciales e intensidades de oxidación y reducción del ferricianuro. Velocidad de barrido,  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la tabla IV.4.1 se muestran los resultados obtenidos para la desviación entre la intensidad de pico experimental y teórica, y la separación

entre los picos de oxidación y reducción de distintos transductores amperométricos correspondientes a los diferentes diseños realizados.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, el comportamiento electroquímico de los dos tipos de transductores es muy similar, ya que no existen grandes diferencias en el funcionamiento de los diseños propuestos. En ambos casos la diferencia entre la intensidad de pico teórica y experimental es de alrededor del 45 %.

**Tabla IV.4.1:** Resultados más significativos obtenidos durante la caracterización de los diferentes dispositivos fabricados.  $\Delta E_p$ , Diferencia de potencial entre picos de oxidación y reducción.  $I_p^{red}$ , Intensidad experimental del pico de reducción.  $I_p^{teor}$ , Intensidad de pico teórica.

|             | Transductor | $\Delta E_p / V$ | $I_p^{red} / mA$ | $I_p^{teor} / mA$ | desviación $I_p^{exp} / I_p^{teor}$ |
|-------------|-------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Rectangular | sp1         | 0.39             | 7.40             | 13.51             | -45%                                |
|             | sp2         | 0.32             | 8.50             | 13.68             | -38%                                |
|             | sp3         | 0.28             | 8.36             | 13.85             | -40%                                |
|             | sp5         | 0.43             | 8.20             | 13.45             | -39%                                |
| Circular    | spr1        | 0.32             | 7.26             | 16.35             | -56%                                |
|             | spr3        | 0.32             | 8.50             | 16.36             | -48%                                |
|             | spr4        | 0.33             | 7.60             | 13.66             | -44%                                |
|             | spr6        | 0.39             | 8.50             | 13.51             | -37%                                |

Siguiendo la ecuación de Randles-Sevcik (4.1) utilizada para calcular la intensidad de pico teórica se puede observar que, en este caso, depende de dos variables, concentración de ferricianuro y área del electrodo de trabajo. A concentración conocida y constante de sustancia electroactiva, la intensidad de pico es función, exclusivamente, del área del electrodo. Por tanto, el valor de desviación de la intensidad es indicativo de que el área real es menor que la teórica.

La separación de los picos de oxidación y reducción fue de 300 mV - 400 mV, lejos de los 59 mV teóricos para un sistema redox basado en ferricianuro. Este comportamiento es típico de los casos en que no existe una buena transferencia de electrones entre la sustancia electroactiva y la superficie del electrodo [17].

El hecho de que la intensidad recogida sea menor que la teórica y la separación de picos mayor, indica que la superficie del electrodo sigue pasivada, a pesar de la activación previa, lo que posiblemente se debe al aglutinante del que está compuesto la tinta de grafito [18] y que no se puede eliminar completamente de la superficie del electrodo [19].

Por ultimo se comprobó la reproducibilidad de los dispositivos fabricados, a partir de la desviación estándar relativa (RSD) de la intensidad de pico obtenida en la caracterización de los electrodos. La RSD asociada a estos resultados es de 7.7% ( $n = 10$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

Este tipo de dispositivos se utilizó para la fabricación de biosensores para la determinación de glucosa en mosto, obteniendo buenos resultados, como se recoge en el capítulo VIII.

## IV.- Bibliografía.

1. N. M. Whitey J. D. Turner, *Thick-film sensors: Past, present and future*. Measurement Science & Technology, **1997**. 8(1): p. 1-20.
2. M. Prudenziati, *Thick Film Sensors*, ed. Elsevier. **1994**, Amsterdam.
3. N. M. White, *Thick film technology*, in *Thick Film Sensors*, M. Prudenziati, Editor. **1994**, Elsevier Science B.V.: Amsterdam.
4. Ingeniería de Sinópticos, *Serigrafía*,(en línea)15/12/05 (30/05/06)  
<http://www.sinopticos.com/serigrafia.html>.
5. Wikipedia Foundation Inc, *Serigrafía*,(en línea)12/04/06 (30/05/06)  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Serigraf%C3%ADa>.
6. R. Dell' Acqua, *Substrates for thick film technology*, in *Thick Film Sensors*, M. Prudenziati, Editor. **1994**, Elsevier Science B.V.: Amsterdam.
7. C. Galan, *Desarrollo de sensores químicos y biosensores por tecnología thick-film*, in *Departamento de Química*. **1996**, Universidad Autónoma de Barcelona: Bellaterra.
8. V. B. Nascimento y L. Angnes, *Screen-printed electrodes*. Quimica Nova, **1998**. 21(5): p. 614-629.
9. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, y S. Alegret, *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2000**. 69(1-2): p. 153-163.
10. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, y S. Alegret, *Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2001**. 79(1): p. 48-57.
11. E. Crouch, D. C. Cowell, S. Hoskins, R. W. Pittson, y J. P. Hart, *Amperometric, screen-printed, glucose biosensor for analysis of human plasma samples using a biocomposite water-based carbon ink incorporating glucose oxidase*. Analytical Biochemistry, **2005**. 347(1): p. 17-23.

12. C. A. Galan-Vidal, J. Munoz, C. Dominguez, y S. Alegret, *Chemical sensors, biosensors and thick-film technology*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **1995**. 14(5): p. 225-231.
13. GPES, *General Purpose Electrochemical System for Windows*, 4.9. **ver. 4.9**, EcoChemie B.V.: Utrech, Holanda 2002
14. C. de Haro, R. Mas, G. Abadal, J. Munoz, F. Perez-Murano, y C. Dominguez, *Electrochemical platinum coatings for improving performance of implantable microelectrode arrays*. BIOMATERIALS, **2002**. 23(23): p. 4515-4521.
15. K. S. Lim, W. J. Chang, Y. M. Koo, y R. Bashir, *Reliable fabrication method of transferable micron scale metal pattern for poly(dimethylsiloxane) metallization*. Lab on a Chip, **2006**. 6(4): p. 578-580.
16. M. S. Chao, J. Electrochem. Soc., **1968**. 115: p. 1172.
17. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. **2001**, New York: John Wiley and Sons, Inc.
18. M. E. Rice, Z. Galus, y R. N. Adams, *Graphite Paste Electrodes - Effects of Paste Composition and Surface-States on Electron-Transfer Rates*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **1983**. 143(1-2): p. 89-102.
19. J. Wang, B. M. Tian, V. B. Nascimento, y L. Angnes, *Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks*. Electrochimica Acta, **1998**. 43(23): p. 3459-3465.

V.- INTEGRACIÓN DEL ELECTRODO DE REFERENCIA.

---

---

## **V.- Objetivos.**

- ✓ Integrar un electrodo de pseudo-referencia en el  $\mu$ transductor amperométrico utilizando óxidos de iridio o de plata, o plata/cloruro de plata.
- ✓ Fabricar estos nuevos electrodos mediante diferentes tecnologías de capa delgada, serigráficas y métodos electroquímicos.
- ✓ Comprobar la estabilidad y la deriva del potencial en equilibrio de estos electrodos mediante potenciometría.
- ✓ Comprobar la viabilidad de la aplicación de estos dispositivos como electrodos de pseudo-referencia en medidas voltamperométricas.

## **V.1.- Introducción.**

Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, el desarrollo de sensores electroquímicos miniaturizados ha aumentado considerablemente en los últimos años [1]. Los transductores amperométricos trabajan bajo un control potencioestático, es decir, necesitan de un elemento capaz de establecer una diferencia de potencial perfectamente controlada entre éste y el electrodo de trabajo. Para este fin se utiliza un electrodo de referencia, un electrodo que tiene un potencial de equilibrio estable y conocido [2].

La dificultad de la miniaturización de estos electrodos de referencia es uno de los principales problemas para la comercialización de los transductores electroquímicos basados en tecnología de silicio [3].

Un electrodo de referencia para medidas amperométricas se caracteriza por [4],

- Mantener el potencial estable durante un largo periodo de tiempo, independientemente de la naturaleza de la disolución.
- Ser capaz de recuperar el valor de potencial de equilibrio en el caso que se de un paso de corriente a través de él.
- Ser insoluble en la solución electrolítica.

Estas características, inherentes a los electrodos de referencia convencionales, no son fáciles de transferir a un sistema miniaturizado.

Se han intentado desarrollar diferentes tipos de electrodos de referencia miniaturizados, a través de las tecnologías de capa delgada y de capa gruesa [5-7]. Uno de los principales problemas para la miniaturización de electrodos de referencia es la integración de la solución del electrolito inerte necesario para obtener un potencial constante e invariable, independientemente de las características de la solución de medida. Se han realizado diferentes pruebas con polímeros basados en agar [3], o PVC [8], pero en ninguno de los casos los electrodos fabricados se caracterizaron con las propiedades de los referencias convencionales.

En la mayoría de los casos, los electrodos de referencia miniaturizados que se obtienen son los llamados pseudo-referencias. En este tipo de electrodos es necesario que se mantenga constante la concentración de un ion determinado en la solución de medida, con el fin de obtener un potencial constante y estable.

Uno de los electrodos de uso más común es el electrodo basado en plata/cloruro de plata. Este electrodo es, en esencia, un electrodo selectivo al ion cloruro, más concretamente a la actividad de éste [5]. La reacción electroquímica que tiene lugar en este electrodo es la siguiente:



El potencial de equilibrio asociado a esta reacción química está relacionado con las actividades de los iones en solución, siguiendo la ecuación de Nernst,

$$E = E_o - 2.303 \left( \frac{RT}{nF} \right) \log a_{cl^-} \quad (5.1)$$

donde,

$E$  = potencial en equilibrio

$E_o$  = potencial en condiciones estándar

$R = 8,314 \text{ J/Kmol}$

$T$  = temperatura

$n$  = número de electrones = 1

$F$  = número de Faraday

$a_{Cl^-}$  = actividad de cloruros,  $a = \gamma [Cl^-]$

En los casos en que la concentración de cloruros sea baja, donde  $\gamma = 1$ , y para una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , el potencial de este electrodo viene dado por la siguiente ecuación,

$$E = E_o - 59.16 \log[Cl^-] \quad (5.2)$$

por lo que manteniendo constante la concentración de cloruros, el potencial de este electrodo también se mantendrá constante.

Por otro lado, ciertos óxidos metálicos están siendo utilizados como electrodos de pseudo-referencia, tales como óxido de iridio ( $\text{IrOx}$ ) [9, 10] o de wolframio ( $\text{WOx}$ ) [11]. Los electrodos formados con  $\text{IrOx}$  han sido utilizados incluso como electrodos sensibles al pH [9, 12-14], ya que presentan una gran estabilidad en un amplio rango de pH y la deriva de potencial es mínima en un periodo largo de tiempo [9,15]. Por tanto, manteniendo constante la concentración de protones de una solución, el potencial de este electrodo también será constante y podría ser utilizado como electrodo de pseudo-referencia.

Este tipo de referencias basados en óxidos metálicos son de gran interés en el campo de la tecnología microelectrónica ya que la formación de electrodos con estos materiales es compatible con la metodología de fabricación microelectrónica.

En este capítulo se presenta la integración y evaluación de diferentes electrodos de pseudo-referencia basados en Ag/AgCl, óxido de plata y óxido de iridio.

Los electrodos de Ag/AgCl fueron construidos mediante dos metodologías diferentes:

- Deposición de una capa gruesa de una tinta de Ag/AgCl sobre la oblea [3, 16, 17].
- Electroformación de una capa de plata que posteriormente se clorinizara.

En el caso de los óxidos metálicos, ambos metales fueron depositados sobre la oblea mediante cañón de electrones, con la diferencia de que el iridio fue oxidado durante la deposición y la plata fue oxidada posteriormente mediante técnicas electroquímicas.

La caracterización de estos electrodos se llevó acabo mediante un estudio de la superficie mediante microscopía confocal, con el fin de comprobar el grosor y rugosidad de las capas depositadas. También se realizaron medidas electroquímicas con el fin de comprobar su viabilidad como pseudo-electrodos de referencia en medidas voltamperométricas.

## **V.2.- Reactivos, equipos y software.**

El proceso de fabricación de los electrodos de pseudo-referencia, en el caso de los óxidos metálicos, se llevó a cabo en las instalaciones de la sala blanca del CNM. Las máscaras necesarias para la fabricación de los dispositivos fueron diseñadas mediante el software Lasi 6.3.2.4 y fabricadas por Photronics, Inc. (Manchester, Reino Unido).

La oxidación electroquímica de estos metales se realizó en una solución de concentración adecuada de NaOH (Panreac, Barcelona, España) en agua.

En el caso de la formación de los electrodos mediante técnicas serigráficas, la tinta de Ag/AgCl utilizada (Electrodag 6037 SS) fue depositada con un equipo serigráfico DEK 248 (DEK, Reino Unido). Las pantallas de 23''x23'', necesarias para la fabricación de los electrodos, fueron diseñadas mediante el programa Lasi 6.3.2.4 y fabricadas por Asflex Internacional (Madrid, España).

Para la deposición electroquímica de la plata se utilizó una solución comercial SILVREX S (Enthone-Omi, Córdoba, España). La clorinización de esta plata se realizó en una solución 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de HCl (Panreac, Barcelona, España).

Los reactivos utilizados para la evaluación de estos electrodos fueron de grado analítico. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (18 MΩ cm).

Las disoluciones de ferricianuro potásico (Merck, Darmstadt, Alemania), utilizadas para verificar la respuesta de estos electrodos, se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de éste en una solución de

tampón fosfato  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  pH 7,  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl (Panreac, Barcelona, Spain).

Los voltamperogramas cíclicos fueron realizados mediante un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie BV, Holanda). Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System GPES [18].

Las medidas de diferencia de potencial entre los electrodos de referencia fabricados y un electrodo de referencia comercial Ag/AgCl  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  (Crison, Barcelona, España) fueron registradas con un pHmetro 301 (Hanna instruments, Eibar, España).

### **V.3.- Fabricación de los electrodos.**

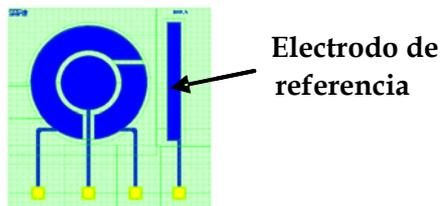
#### **V.3.1.- Pseudo-referencias basados en Ag/AgCl.**

##### **V.3.1.1. - Combinación de tecnología “*thin y thick film*”.**

En este caso, la fabricación de los electrodos de pseudo-referencia se realizó mediante tecnología de capa gruesa. Sobre una oblea fabricada según el proceso descrito en el capítulo IV, se depositó mediante serigrafía una capa de tinta de plata / cloruro de plata.

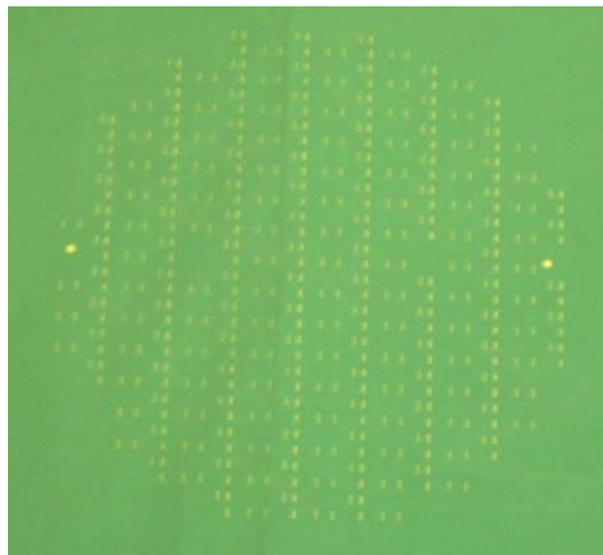
Como se muestra en el capítulo de fabricación de microsensores amperométricos basados en tecnología de silicio, durante el diseño de éstos se tuvo en cuenta la posterior fabricación de este tipo de electrodos y se definió

un motivo de platino (Fig. V.3.1) que se modificó para actuar como electrodo de referencia.



**Figura V.3.1:** *Diseño del microsensor amperométrico.*

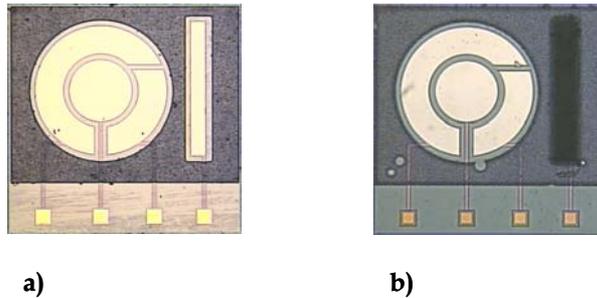
Teniendo en cuenta la geometría de estos dispositivos, se diseñó una pantalla que permitiera depositar tinta de Ag/AgCl sobre la barra de platino (Fig. V.3.2).



**Figura V.3.2:** *Fotografía de la pantalla para la deposición de tinta Ag/AgCl.*

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo V para la fabricación de electrodos serigráficos, se depositaron dos capas de tinta de plata/cloruro de plata sobre la oblea, asegurando así la formación de una capa uniforme que cubrirá completamente el platino.

La oblea se sometió a un ciclo térmico, 80 °C durante 30 minutos seguido de 120 °C durante 5 minutos más, para realizar el curado de la tinta. Este proceso debe llevarse a cabo de manera gradual para evitar que se generen tensiones en la capa de Ag/AgCl.



**Figura V.3.3** Fotografía de un microsensor antes (a) y después (b) de depositar la tinta.

Una vez finalizado el proceso de fabricación, la oblea fue cortada y los chips una vez individualizados fueron soldados sobre un soporte de PCB y encapsulados con Ebecryl.

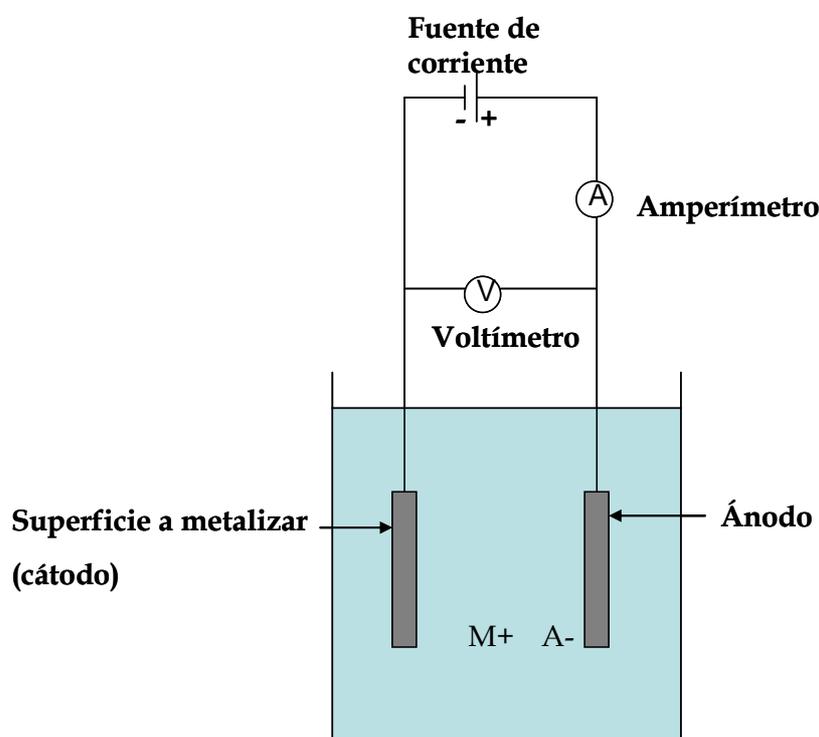
#### V.3.1.2.- Pseudo-referencias fabricados electroquímicamente.

La formación electroquímica del electrodo de pseudo-referencia se realizó una vez que los transductores estuvieron individualizados y soldados sobre un sustrato de PCB.

Este proceso se llevó a cabo en dos etapas,

- Electrodeposición de una capa de plata sobre un electrodo de platino.
- Clorinización de dicha plata.

La electrodeposición es una técnica que consiste en la formación de una capa delgada, generalmente metálica, sobre una superficie debido a la acción de una corriente eléctrica. La superficie que se quiere cubrir se sumerge en una solución de una sal del metal que se quiere depositar, y a continuación, se aplica una carga negativa sobre esta superficie, que actuando como cátodo, atrae al catión reduciéndolo a su forma metálica y depositándose sobre la superficie. La celda electroquímica se completa mediante un ánodo formado, generalmente, por el mismo metal que se quiere depositar [19]. En la figura V.3.4 se muestra, de manera esquemática, una celda electroquímica para la deposición de un metal M sobre la superficie catódica.



**Figura V.3.4:** Esquema de una celda electroquímica para la electrodeposición de un metal.

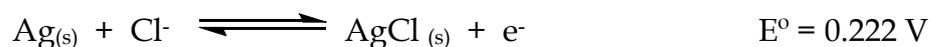
Para la electrodeposición de plata se utilizó una solución comercial (silvrex-s), un hilo de plata como ánodo y como cátodo, la barra de platino de los transductores de diseño circular (capítulo III) diseñada para actuar como electrodo de referencia.

La intensidad aplicada, según las especificaciones del baño de plata comercial, fue de 3  $\mu\text{A}$  durante 2 minutos para depositar 1  $\mu\text{m}$  de Ag.

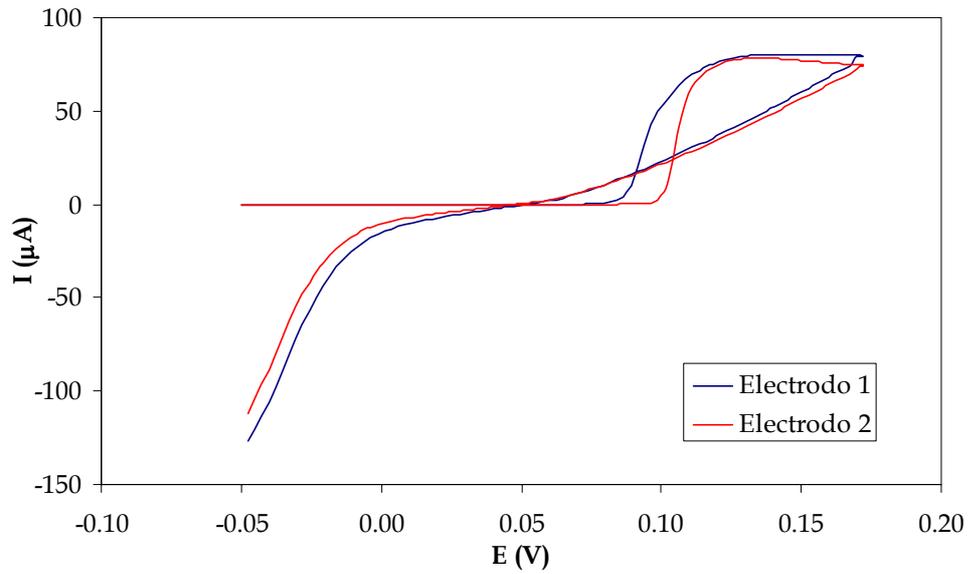
Cabe destacar que antes de la electroformación de la capa de Ag, es necesario realizar una limpieza electroquímica del electrodo de platino sobre el que se depositará la plata posteriormente. Esta activación de la superficie se realizó mediante sucesivos voltamperogramas cíclicos en una solución 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  de KCl, tal y como se describe en la sección III.5.

Una vez depositada la capa de plata se procedió a la formación del cloruro de plata. Para conseguir una capa de Ag/AgCl de la mayor pureza posible fue necesario realizar una limpieza química de la plata depositada. Ésta se realizó sumergiendo el  $\mu$ transductor en una solución de amoníaco concentrado durante una hora y, seguidamente, en una de ácido nítrico 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  durante dos horas [20].

El proceso de clorinización consiste en la oxidación de la plata a  $\text{Ag}^+$ , de tal manera que en presencia de iones cloruro, se deposita sobre la superficie del electrodo en forma de cloruro de plata, debido a la insolubilidad de esta sal. Este proceso electroquímico se lleva a cabo según la siguiente reacción,

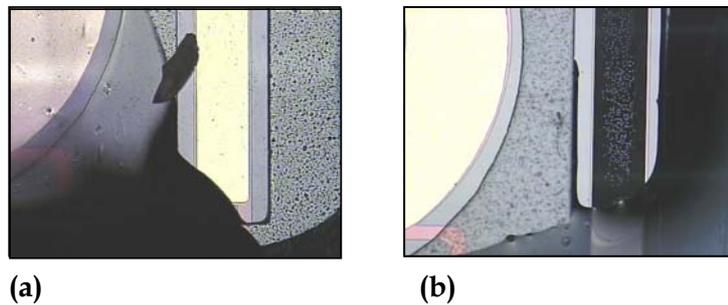


La clorinización se llevó a cabo sumergiendo el transductor en una solución 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$  de HCl [20] y registrando un voltamperograma cíclico partiendo del potencial de circuito abierto, - 0.2 V, y aumentando lentamente el potencial aplicado hasta que se observó un aumento de intensidad que indica la oxidación de la plata y la formación de la capa de AgCl (Fig. V.3.5).



**Figura V.3.5:** Voltamperograma cíclico para la clorinización de dos electrodos de plata electrodepositada. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura V.3.6 se muestra una imagen de un electrodo antes y después de la clorinización. Como se puede observar, la superficie del electrodo de referencia ha oscurecido debido a la deposición del cloruro de plata.



**Figura V.3.6:** Fotografía de un microsensor antes (a) y después (b) de la clorinización.

### V.3.2.- Pseudo-referencias basados en óxidos metálicos.

La formación de los electrodos basados en óxidos metálicos se realizó, a nivel de oblea, durante el proceso de fabricación de los microsensors, lo que implica añadir una etapa más. Los microelectrodos amperométricos sobre los que se realizó este proceso fueron los de geometría rectangular.

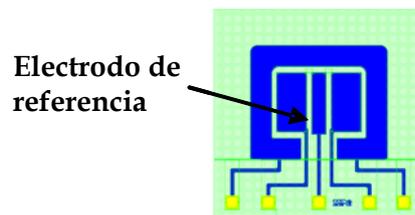


Figura V.3.7: Diseño del microsensor amperométrico

Previo a la etapa final, la deposición de la capa de pasivación de oxinitruro de silicio (sección IV.4.2, Fig. IV.4.4), se depositó, mediante la técnica de cañón de electrones (sección IV.2.1.2.1), una delgada capa del metal correspondiente, iridio o plata.

Tanto la geometría como la posición de estos electrodos fueron definidas mediante "lift-off" (sección IV.2.3). Con este fin, fue necesario diseñar y fabricar una nueva máscara con los motivos geométricos necesarios para este proceso.

#### V.3.2.1.- Pseudo-referencias basados en óxido de iridio.

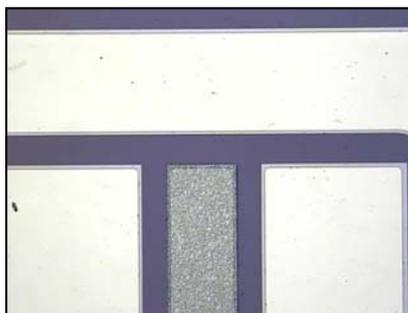
Se depositó la capa de óxido de iridio mediante la técnica de deposición física en fase gas (sección III.2.1.2.1). Con la oblea introducida en un equipo de PVD, una muestra de iridio de gran pureza (99.99%) fue bombardeada con electrones en una cámara de baja presión, para conseguir

su evaporación. Generalmente, este proceso se realiza bajo una atmósfera de gases inertes para evitar la reacción del metal a depositar. En este caso, puesto que se quiere depositar una capa de óxido de iridio, este proceso de evaporación y deposición se llevó a cabo en presencia de oxígeno [21].

Finalizada la etapa de formación y deposición del óxido, la oblea fue sumergida en acetona para eliminar mediante "lift off" la fotoresina endurecida y con ella, la capa de óxido de iridio sobrante.

Una vez formado el electrodo de pseudo-referencia el proceso de fabricación continuó con la formación de la capa de pasivante de oxinitruro de silicio tal y como se describe en el apartado III.4.2.

Con el proceso de fabricación ya finalizado, la oblea se cortó para individualizar los chips, que fueron soldados y encapsulados sobre un soporte de PCB.



**Figura V.3.8** Imagen parcial de un electrodo de óxido de iridio una vez finalizado el proceso fabricación en sala blanca.

### V.3.2.2.- Pseudo-referencias basados en óxido de plata.

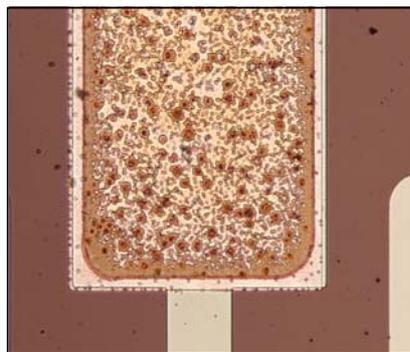
El proceso de fabricación de los electrodos basados en óxido de plata es similar al de la formación del óxido de iridio, con la diferencia de que la plata

es oxidada electroquímicamente una vez que el proceso de fabricación ha finalizado.

Inicialmente se depositó una capa de 20 nm de titanio para mejorar la posterior adhesión de la plata sobre el platino. A continuación, se depositaron 200 nm de plata mediante cañón de electrones y en ausencia de oxígeno, para evitar la oxidación de la plata. Una vez depositados los metales, se eliminó la fotoresina, que previamente se había depositado sobre la oblea, mediante "lift-off", y con ella la plata sobrante.

Una vez definida la geometría de los electrodos, el proceso de fabricación de la oblea continuó de la misma manera que en el caso anterior. Se depositó sobre la oblea una capa de pasivante, oxinitruro de silicio, que posteriormente fue cortada para individualizar los chips.

Como se observa en la figura V.3.9, la plata quedó parcialmente oxidada después del proceso de fabricación de los chips, ya que la formación de la capa de oxinitruro de silicio se realiza a 300°C y en presencia de oxígeno.



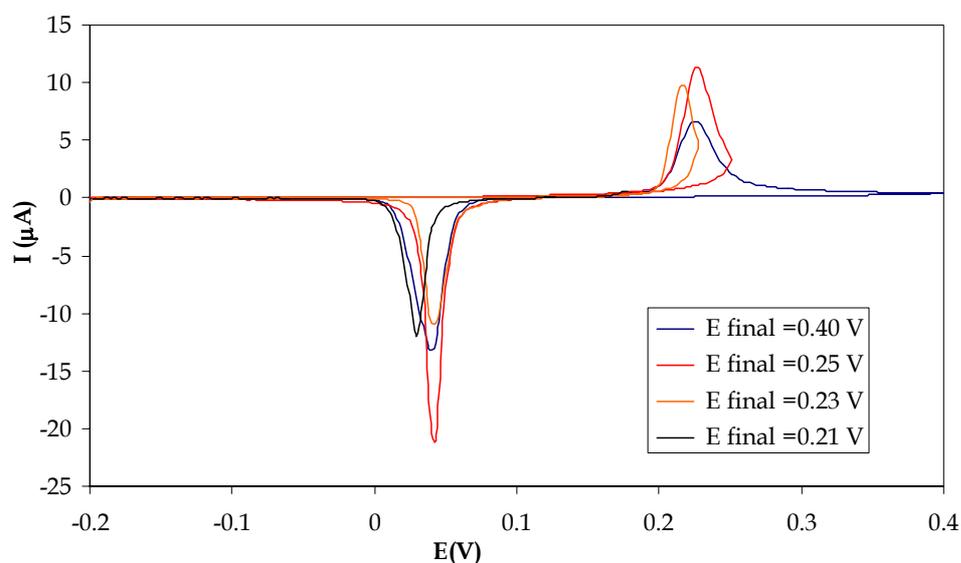
**Figura V.3.9:** *Imagen de la parte inferior de un electrodo de referencia una vez finalizado el proceso de fabricación en sala blanca.*

Una vez los sensores amperométricos fueron soldados y encapsulados sobre tiras de PCB, se procedió a la oxidación de la plata.

Según la reacción electroquímica que se presenta a continuación, la plata puede ser oxidada en un medio básico aplicando potenciales positivos,

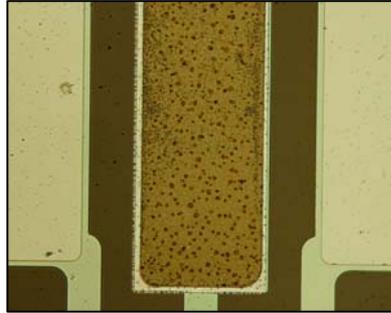


Se sumergieron diferentes transductores en una solución  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaOH [22] y se registró un voltamperograma cíclico para cada uno de ellos a una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Los barridos de potencial se realizaron partiendo del potencial de circuito abierto ( $-0.2 \text{ V}$ ) hasta cuatro potenciales finales diferentes  $0.4 \text{ V}$ ,  $0.25 \text{ V}$ ,  $0.23 \text{ V}$  y  $0.2 \text{ V}$  (Fig. V.3.6), para testar en cual de los casos se obtiene un óxido que actúe mejor como electrodo de pseudo-referencia.



**Figura V.3.6:** Voltamperogramas cíclicos para la oxidación de los electrodos de plata. Velocidad de barrido  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura V.3.7 se muestra la imagen de un electrodo de referencia una vez realizada la oxidación electroquímica.



**Figura V.3.7:** *Imagen parcial de un electrodo de referencia una vez finalizado el proceso oxidación.*

## **V.4.- Caracterización de los electrodos.**

La etapa que sucede a la fabricación de los pseudo-referencias es la caracterización de los mismos, que se realizó en varias subetapas.

Inicialmente, se llevó a cabo un estudio de la superficie de los electrodos, mediante microscopía confocal, para determinar el grosor y la rugosidad de las capas formadas.

Seguidamente, la caracterización realizada fue electroquímica. Potenciométricamente, se determinó la estabilidad del potencial a una concentración constante y conocida de los iones  $\text{Cl}^-$  o  $\text{H}^+$ . De la misma manera, se comprobó la recuperación del potencial de equilibrio de estos electrodos ante variaciones de la concentración de estos iones, así como su comportamiento nernstiano.

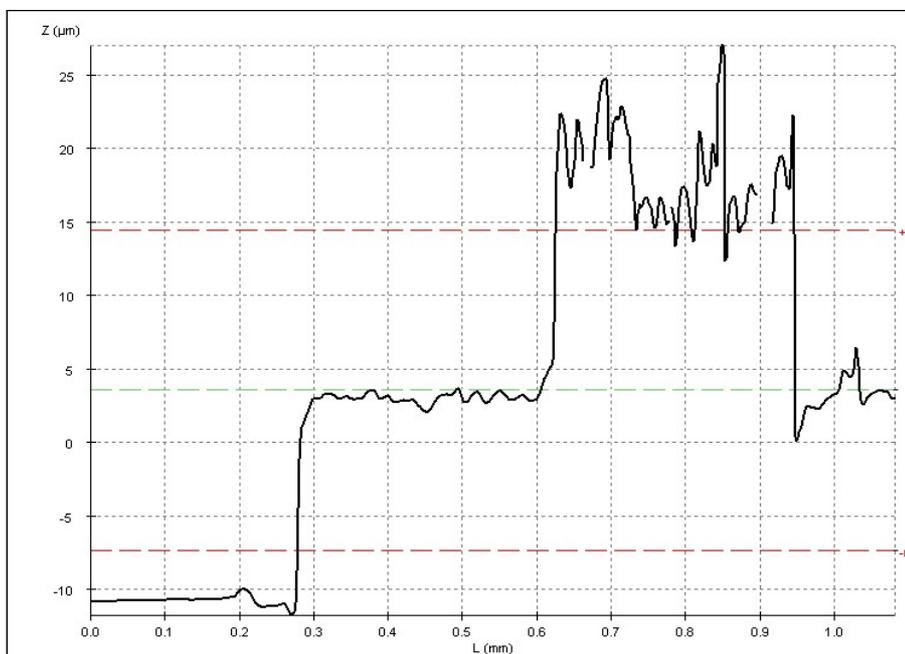
Por último, se realizaron medidas voltamperométricas con estos  $\mu$ transductores para comprobar la viabilidad de la utilización de estos electrodos de pseudo-referencias en el análisis de distintas muestras.

### **V.4.1.- Pseudo-referencias basados en Ag/AgCl.**

#### **V.4.1.1.- Combinación de tecnologías “*thin* y *thick film*”.**

El grosor y la rugosidad de la capa depositada se determinaron a través de las imágenes registradas mediante un microscopio confocal. Como se puede ver en la figura V.4.1, tanto el grosor ( $25,3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ )

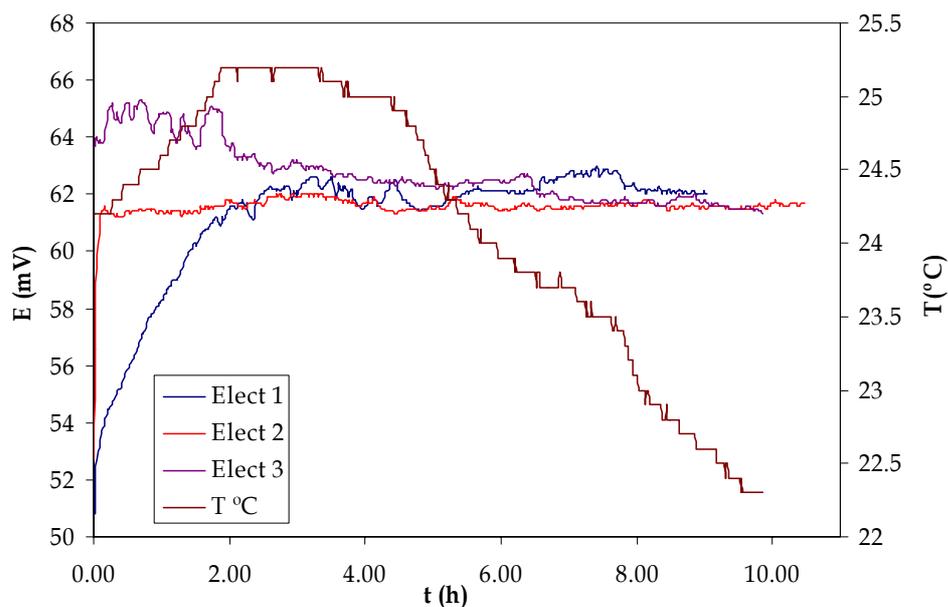
como la rugosidad ( $1.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ,  $n = 6$ ,  $\alpha = 0.05$ ) son similares a los obtenidos en la fabricación de electrodos serigráficos.



**Figura V.4.1:** Perfil de un electrodo de pseudo-referencia fabricado con tinta de Ag/AgCl.

La estabilidad y la deriva del pseudo-referencia de Ag/AgCl se analizó a través de medidas de potencial frente a un electrodo de referencia comercial en una solución  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl.

Como se puede observar en la figura V.4.2 durante las dos primeras horas de medida el potencial no es estable, debido al proceso de hidratación del electrodo de pseudo-referencia. Una vez alcanzado el equilibrio en la interfase solución-electrodo, las medidas ya se mantuvieron estables durante más de 8 horas, en las que el potencial apenas sufrió variación alguna. La deriva obtenida fue inferior a  $0.25 \text{ mV h}^{-1}$  en todos los casos. De la misma manera, el valor medio de potencial de estos electrodos fue muy similar en los tres casos (Tabla V.4.1).

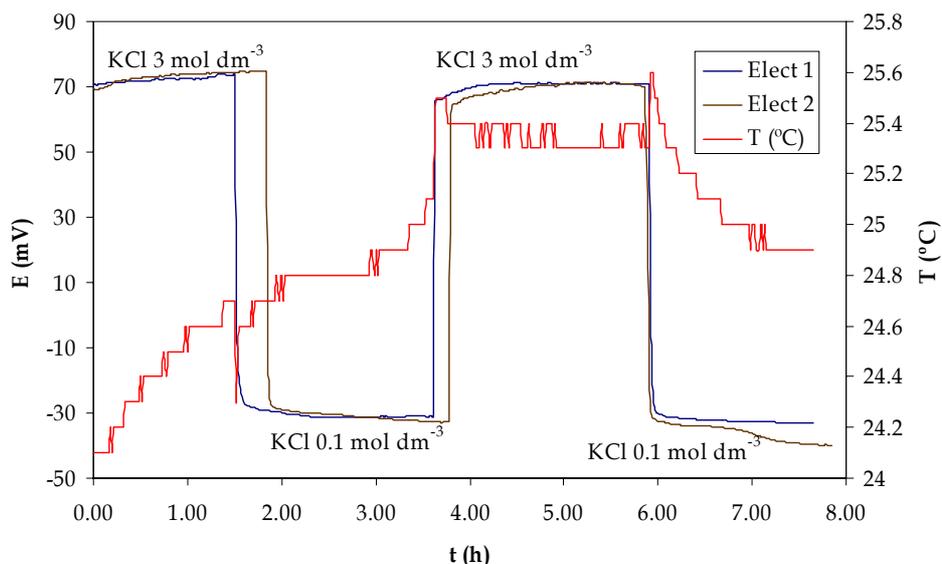


**Figura V.4.2:** Potenciometría de tres electrodos de pseudo-referencia en una solución 3 mol  $dm^{-3}$  de KCl.

**Tabla V.4.1:** Valores de la media y la deriva para cada uno de los electrodos estudiados.

| Electrodo | media (mV) | deriva (mV h <sup>-1</sup> ) |
|-----------|------------|------------------------------|
| 1         | 62.1       | 0.13                         |
| 2         | 61.6       | 0.07                         |
| 3         | 62.3       | 0.23                         |

Seguidamente, se estudió la capacidad de estos electrodos para recuperar del potencial de equilibrio ante cambios bruscos en la concentración de cloruros. Con este fin se realizaron medidas de diferencia de potencial en soluciones de Cl<sup>-</sup> con diferentes concentraciones, 3 mol dm<sup>-3</sup> y 0.1 mol dm<sup>-3</sup>, en intervalos de dos horas (Fig. V.4.3). En ambos casos el potencial recuperó el valor en equilibrio de una manera rápida.



**Figura V.4.3:** Potenciometría de dos electrodos de pseudo-referencia en soluciones de 3 mol  $dm^{-3}$  y 0.1 mol  $dm^{-3}$  de KCl.

Otra de las características requeridas para los electrodos de referencia es que se comporten de acuerdo a la ecuación de Nernst (5.2). En el caso de los electrodos integrados en chips mediante técnicas serigráficas, se midió el potencial de 3 de estos pseudo-referencias en un rango de concentraciones de 0.001 mol  $dm^{-3}$  a 0.1 mol  $dm^{-3}$  de KCl.

La tabla V.4.2 muestra los parámetros obtenidos de las rectas de E vs  $\log a_{Cl^-}$ , construidas en dicho intervalo de concentración.

**Tabla V.4.2:** Parámetros de las rectas construidas con tres pseudo-referencias en un intervalo de concentraciones de 0.001 mol  $dm^{-3}$  a 0.1 mol  $dm^{-3}$  de KCl.

| Pseudo-referencia | Pendiente (mV)    | $E^{\circ}$ (mV)   | $R^2$ |
|-------------------|-------------------|--------------------|-------|
| 1                 | 58.5              | -16.6              | 0.998 |
| 2                 | 56.4              | -11.2              | 0.998 |
| 3                 | 55.6              | -13.3              | 0.995 |
| <b>media</b>      | <b>56.8 ± 1.5</b> | <b>-13.7 ± 3.1</b> |       |

Como puede observarse, los valores de la pendiente son muy cercanos a los 59 mV teóricos dados por la ecuación de Nernst, siendo los valores de potencial estándar ( $E^{\circ}$ ) similares entre ellos.

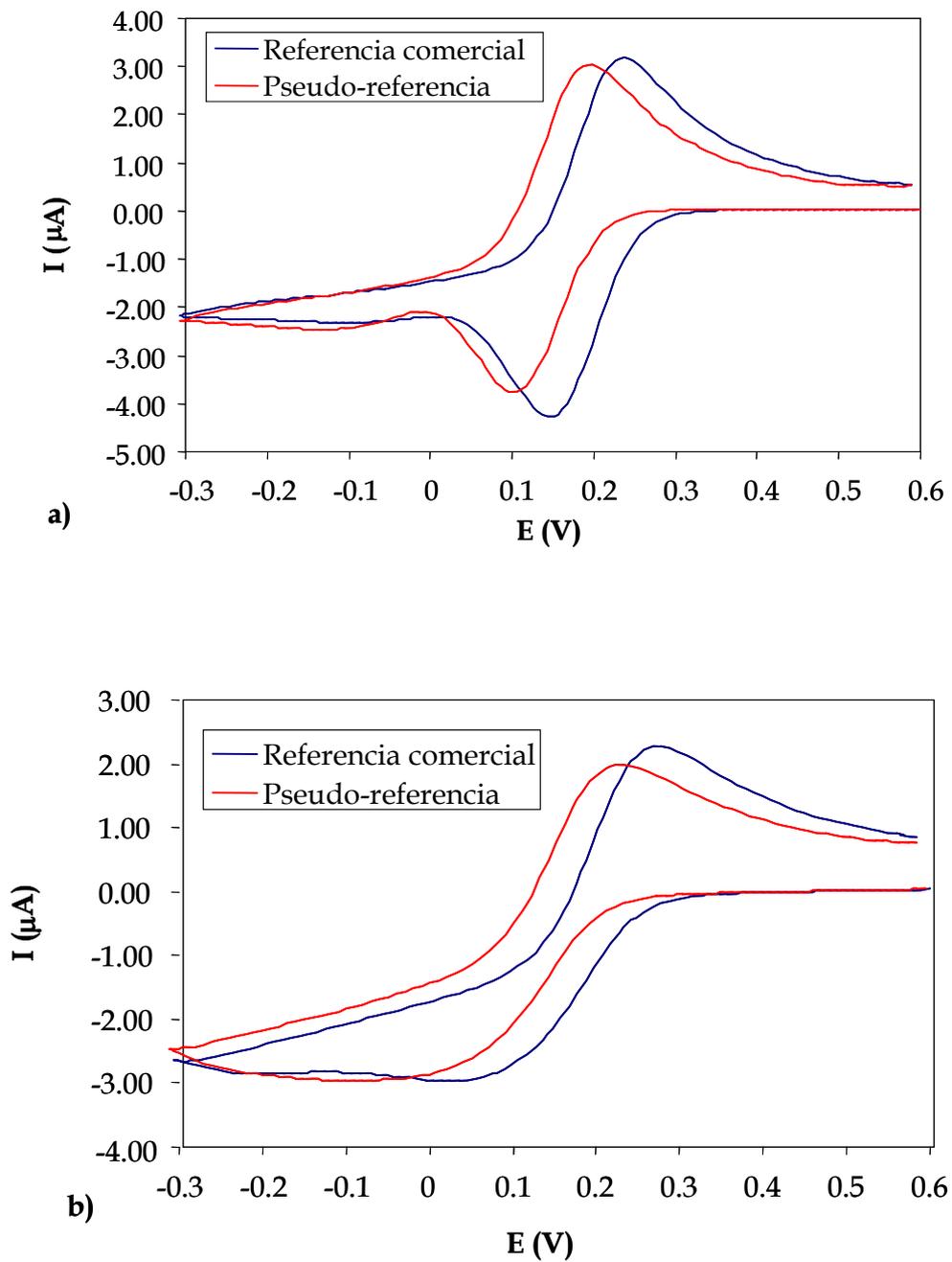
Finalmente, la viabilidad de estos electrodos para su aplicación en el registro de medidas voltamperométricas se estudió a través del análisis de una solución 5 mmol  $\text{dm}^{-3}$  de ferricianuro disuelto en KCl 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$ .

Se realizaron barridos de potencial entre 0.6 V y - 0.3 V, utilizando como electrodo de referencia un electrodo comercial Crison y el electrodo de pseudo-referencia fabricado con tinta de Ag/AgCl. En ambos casos se utilizaron los electrodos de platino integrados en el transductor como electrodo de trabajo y contraelectrodo.

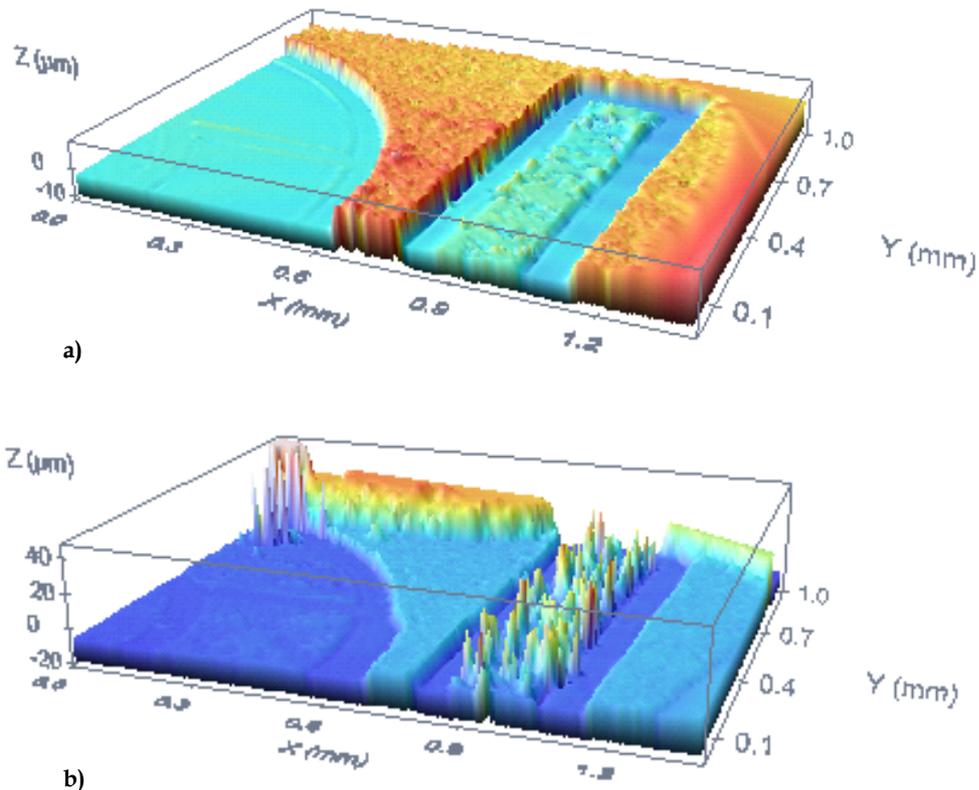
Como se puede observar en la figura V.4.4, en ambos casos, el voltamperograma cíclico registrado con el electrodo fabricado se corresponde con el registrado con el electrodo de referencia comercial. Se puede ver un ligero desplazamiento a potenciales más negativos en el caso del electrodo de pseudo-referencia, lo que se atribuye a la diferencia de concentración de cloruros en contacto con la superficie del electrodo (pseudos referencia, 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$ ; referencia comercial, 3 mol  $\text{dm}^{-3}$ ).

#### V.4.1.2.- Pseudo-referencias fabricados electroquímicamente.

El grosor de la capa de plata depositada y la rugosidad de ésta una vez formado el cloruro de plata (Fig. V.4.5) se caracterizaron mediante microscopía confocal, para lo que se tomaron imágenes antes y después de la clorinización del electrodo.



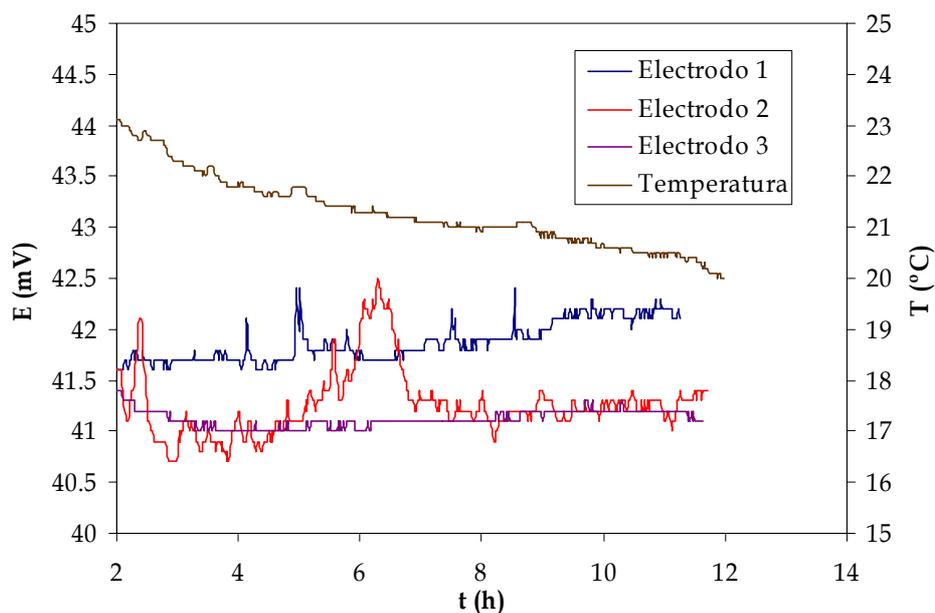
**Figura V.4.4:** Voltamperogramas cíclicos de dos transductores diferentes en una solución 5 mmol dm<sup>-3</sup> de ferricianuro utilizando un electrodo de referencia comercial y uno de pseudo-referencia. Velocidad de barrido, 100mV s<sup>-1</sup>.



**Figura V.4.5:** Imágenes de un electrodo de plata antes (a) y después (b) de clorinizar.

Como se observa en la figura anterior, tanto el grosor como la rugosidad del electrodo de pseudo-referencia, la figura rectangular que aparece a la derecha de la imagen a 0.9 mm en el eje X, aumentan de forma considerable, lo que confirma la formación de granos de cloruro de plata sobre la superficie del electrodo durante el proceso de clorinización.

Con el fin de analizar la estabilidad del electrodo, se sumergió el dispositivo en una solución  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl y se midió la diferencia de potencial entre el electrodo de pseudo-referencia fabricado y un electrodo de referencia comercial (Fig. V.4.6). Antes de realizar las medidas estos electrodos se sumergieron durante 24 horas en esta solución para facilitar que se alcanzara al estado de equilibrio necesario para obtener un potencial estable.



**Figura V.4.6:** Potenciometría de tres electrodos de pseudo-referencia en una solución  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl.

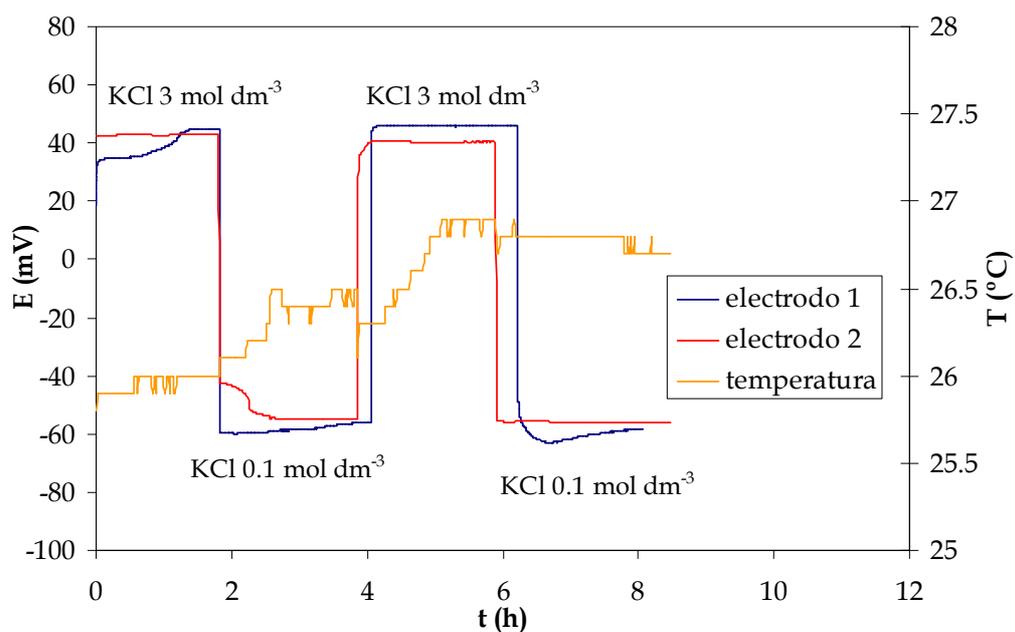
Como puede observarse en la figura anterior, la diferencia de potencial es estable durante más de 10 horas una vez alcanzado el potencial de equilibrio de la interfase. La deriva obtenida no supera en ningún caso  $0.1 \text{ mV h}^{-1}$  y el valor medio de potencial es muy similar en los tres casos (Tabla V.4.3).

**Tabla V.4.3:** Valores de la media y la deriva para cada uno de los electrodos estudiados.

| Electrodo | media (mV) | deriva ( $\text{mV h}^{-1}$ ) |
|-----------|------------|-------------------------------|
| 1         | 41.8       | 0.06                          |
| 2         | 41.3       | 0.08                          |
| 3         | 41.5       | 0.03                          |

Como en el caso anterior, una vez realizado el estudio de la deriva de potencial de estos electrodos se comprobó la capacidad de éstos para la recuperación del valor de potencial de equilibrio ante cambios en la concentración cloruros.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección V.4.1.1 se registraron medidas de diferencia de potencial en soluciones de cloruros de concentraciones  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  y  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , en intervalos de dos horas (Fig. V.4.7). En ambos casos el potencial recuperó el valor de equilibrio de una manera rápida.



**Figura V.4.7:** Potenciometría de dos electrodos de pseudo-referencia en soluciones  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  y  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl.

Se comprobó si la respuesta de este tipo de electrodos de pseudo-referencia siguen un comportamiento nernstiano, para lo que se registró una potenciometría con tres electrodos diferentes en un rango de concentración de

0.001 mol dm<sup>-3</sup> - 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl. En la tabla V.4.4 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla V.4.4:** *Parámetros de las rectas construidas con tres pseudo-referencias en un intervalo de concentraciones de 0.001 mol dm<sup>-3</sup> a 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl.*

| Pseudo-referencia | Pendiente (mV)    | E° (mV)           | R <sup>2</sup> |
|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| 1                 | 51.5              | 6.38              | 0.998          |
| 2                 | 47.3              | 8.17              | 0.999          |
| 3                 | 52.3              | 6.02              | 0.997          |
| <b>media</b>      | <b>50.4 ± 3.1</b> | <b>6.85 ± 1.3</b> |                |

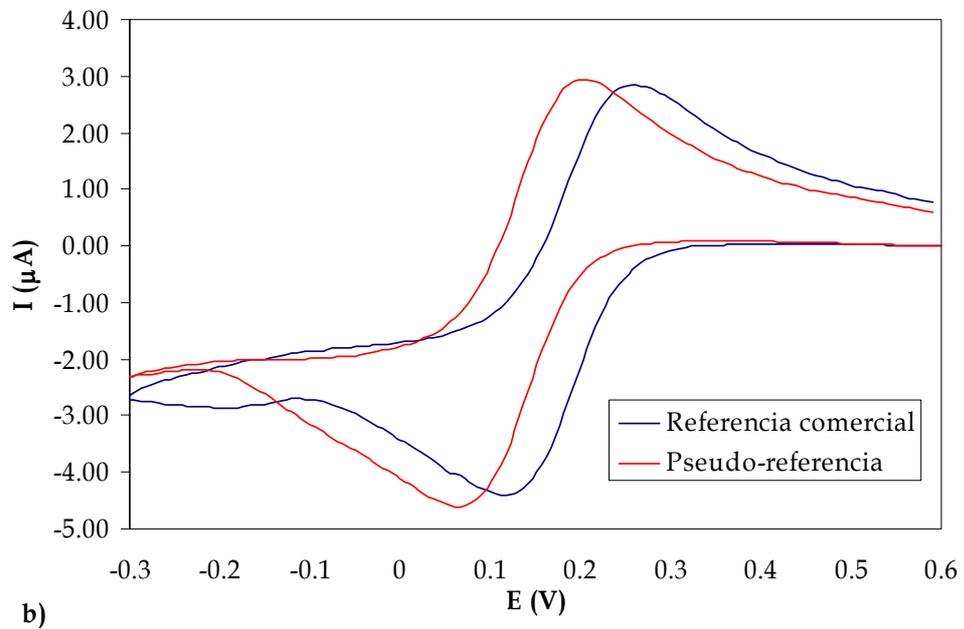
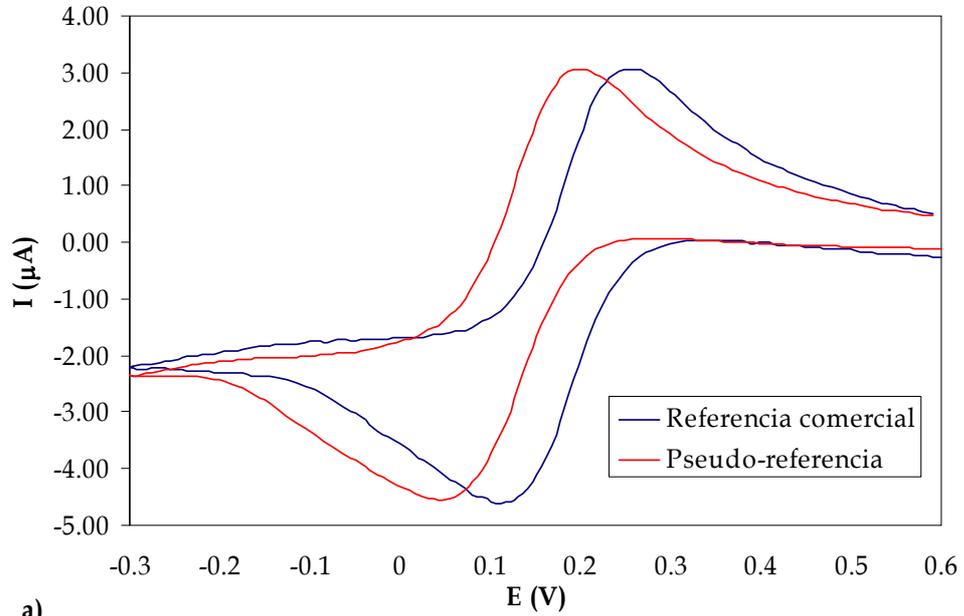
El valor medio de la pendiente es de 50.4 mV, que ligeramente dista de los 59 mV teóricos.

Por último se estudió la posibilidad de la aplicación de estos electrodos basados en plata clorinizada como electrodos de pseudo-referencia en medidas voltamperométricas.

Se realizaron diferentes voltamperometrias cíclicas en una solución 5 mmol dm<sup>-3</sup> de ferricianuro, disuelto en KCl 0.1 mol dm<sup>-3</sup>, utilizando como electrodos de trabajo y contraelectrodo los integrados para este fin en los  $\mu$ transductores amperométricos. Para poder comprobar la viabilidad de estos electrodos como electrodos de pseudo-referencia, se repitieron estos voltamperogramas utilizando un electrodo de referencia comercial.

Puede observarse en la figura V.4.8 que en ambos casos, el voltamperograma registrado utilizando el electrodo de pseudo-referencia se corresponde con el realizado con el referencia comercial, con una diferencia de potencial de 100 mV, aproximadamente. Esta leve diferencia puede atribuirse nuevamente a la diferencia de concentración de cloruros en

contacto con la sal de cloruro de plata que forma los electrodos de pseudo referencia y comercial.

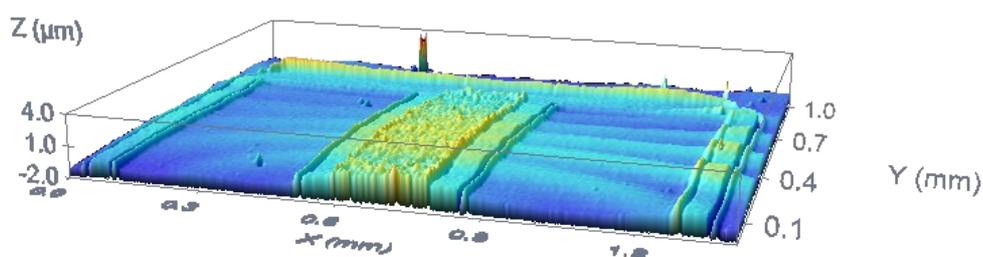


**Figura V.4.8:** Voltamperogramas cíclicos de dos transductores diferentes en una solución 5 mmol dm<sup>-3</sup> de ferricianuro utilizando un electrodo de referencia comercial y uno de pseudo-referencia. Velocidad de barrido, 100mV s<sup>-1</sup>.

## V.4.2.- Pseudo-referencias basados en óxidos metálicos.

### V.4.2.1.- Pseudo-referencias basados en óxido de iridio.

Como en los casos anteriores, antes de caracterizar electroquímicamente estos electrodos de pseudo-referencia se capturaron diferentes imágenes de la superficie de los transductores con un microscopio confocal para poder determinar el grosor y la rugosidad de la capa depositada de óxido de iridio (Fig. V.4.9).



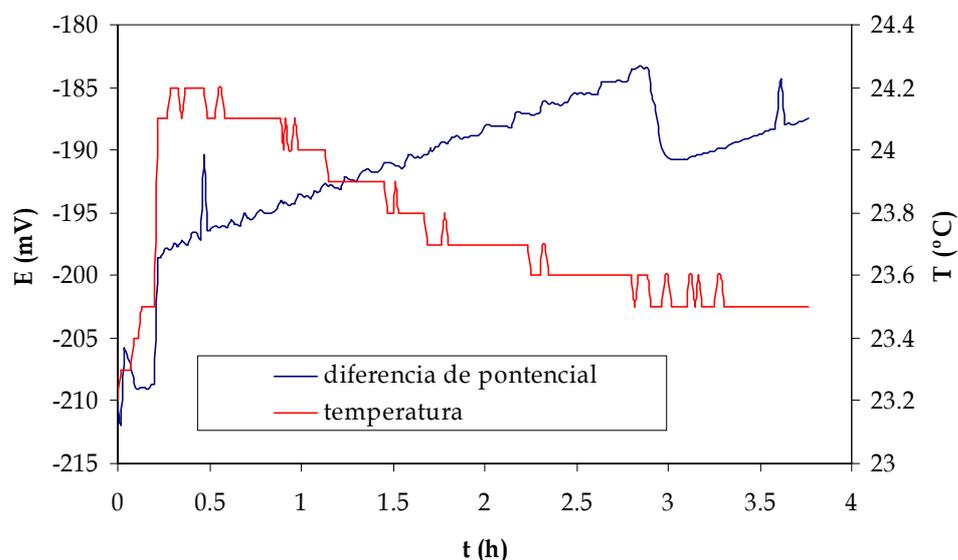
**Figura V.4.9:** Imagen confocal de una sección de un transductor con un electrodo de referencia de óxido de iridio, rectángulo central.

El grosor obtenido fue de  $792 \pm 49$  nm ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y la rugosidad de  $149 \pm 17$  nm ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ). Según los parámetros utilizados para la deposición del iridio, se esperaba una capa de unos 150 nm, pero como ya se ha comentado, esta deposición se realizó en presencia de oxígeno, por lo que el material depositado en la capa es iridio oxidado, lo que explica este mayor grosor.

A continuación se procedió a la caracterización electroquímica de los electrodos. Se comprobó la estabilidad y la deriva de los pseudo-referencias basados en óxido de iridio midiendo la diferencia de potencial frente a un

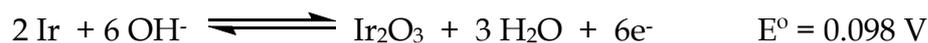
electrodo de referencia comercial en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato pH 7. Cabe destacar que el electrodo estuvo sumergido en esta solución durante 24 horas antes de realizar las medidas de potencial, para asegurar así que la superficie de éste estuviera perfectamente hidratada.

Como se puede ver en la figura V.4.10, la deriva obtenida para este electrodo es de unos  $6 \text{ mV h}^{-1}$ , lo que indica que el óxido de iridio formado no tiene una buena estabilidad a lo largo del tiempo y, por tanto, no se recomienda su utilización como electrodo de referencia.

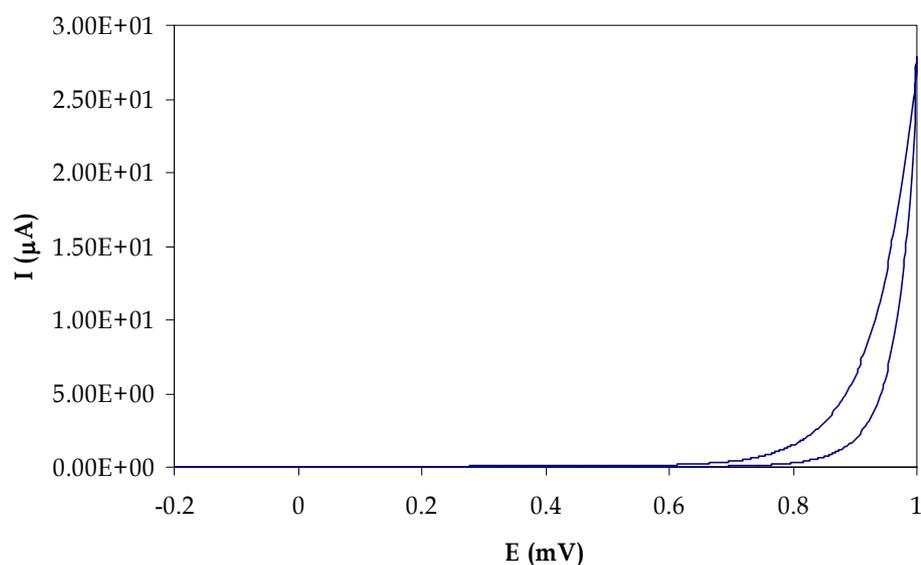


**Figura V.4.10:** Potenciometría de un electrodo de pseudo-referencia basado en óxido de iridio en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato pH 7.

Con la intención de mejorar esta respuesta se intentó sobreoxidar estos electrodos siguiendo el mismo procedimiento descrito para la oxidación de la plata (sección V.3.2.2.). Según la reacción que se presenta a continuación es posible oxidar iridio electroquímicamente, aplicando potenciales positivos en un medio básico.



Para llevar a cabo esta oxidación se sumergió el electrodo en una solución  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  de NaOH y se registró un voltamperograma cíclico partiendo de  $-0.2 \text{ V}$  (potencial de circuito abierto) y aumentando lentamente el potencial aplicado (velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ) hasta observar un pico de intensidad que indicara la oxidación del iridio (Fig. V.4.11).

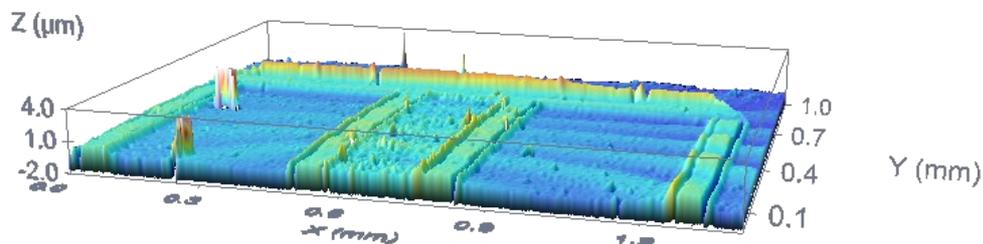


**Figura V.4.11:** Voltamperograma cíclico para la sobreoxidación de un electrodo de óxido de iridio. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Puede observarse, en la figura anterior, que la intensidad aumenta a partir de  $0.7 \text{ V}$ , llegando a la barrera electroquímica sin llegar a sobreoxidarse el electrodo.

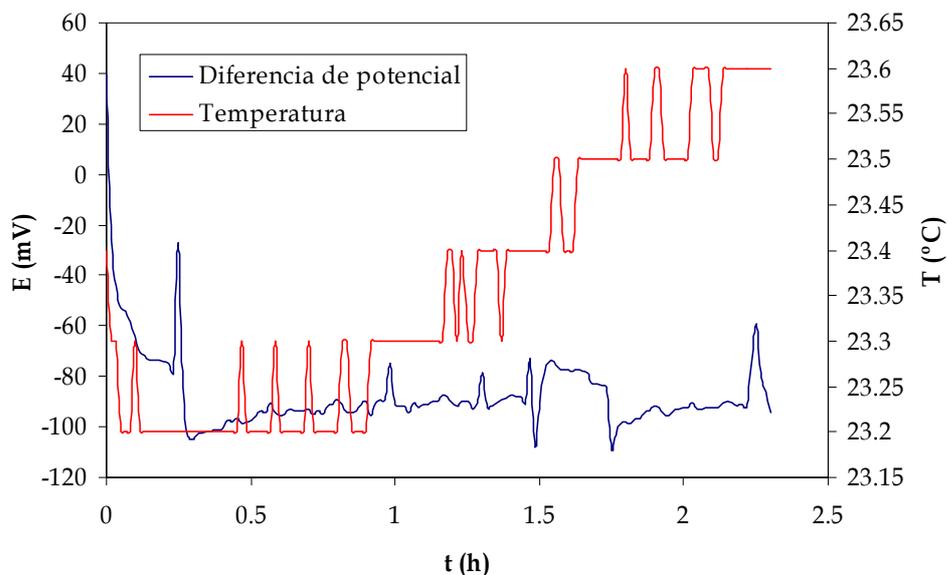
Con el fin de comprobar este hecho se realizó un nuevo estudio de superficie, para analizar las posibles diferencias en el grosor y la rugosidad antes y después de la sobreoxidación (Fig. V.4.12).

El grosor obtenido en este caso fue de  $663 \pm 87$  nm ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y la rugosidad fue de  $159 \pm 63$  nm ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ), valores del mismo orden que los obtenidos antes de este proceso.



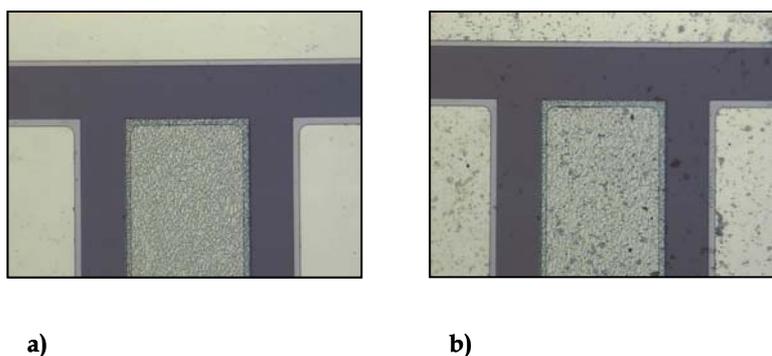
**Figura V.4.12:** Imagen confocal de un transductor con un electrodo de referencia de óxido de iridio después de la sobreoxidación.

Análogamente a la caracterización de los pseudo referencias, se midió la diferencia de potencial entre el electrodo fabricado y un referencia comercial. Como se muestra en la figura V.4.13, las medidas tienen incluso menor estabilidad que antes de someter el electrodo a este tratamiento.



**Figura V.4.13:** Potenciometría de un electrodo de pseudo-referencia basado en óxido de iridio sobreoxidado en una solución de fosfato a pH 7.

Teniendo en cuenta que no se observan cambios sustanciales en las medidas de grosor y rugosidad de la capa de óxido de iridio, ni hay grandes diferencias en un análisis visual de estos electrodos (Fig. V.4.14), puede asegurarse que el proceso de sobreoxidación de este electrodo no ha modificado de manera significativa la superficie del mismo.



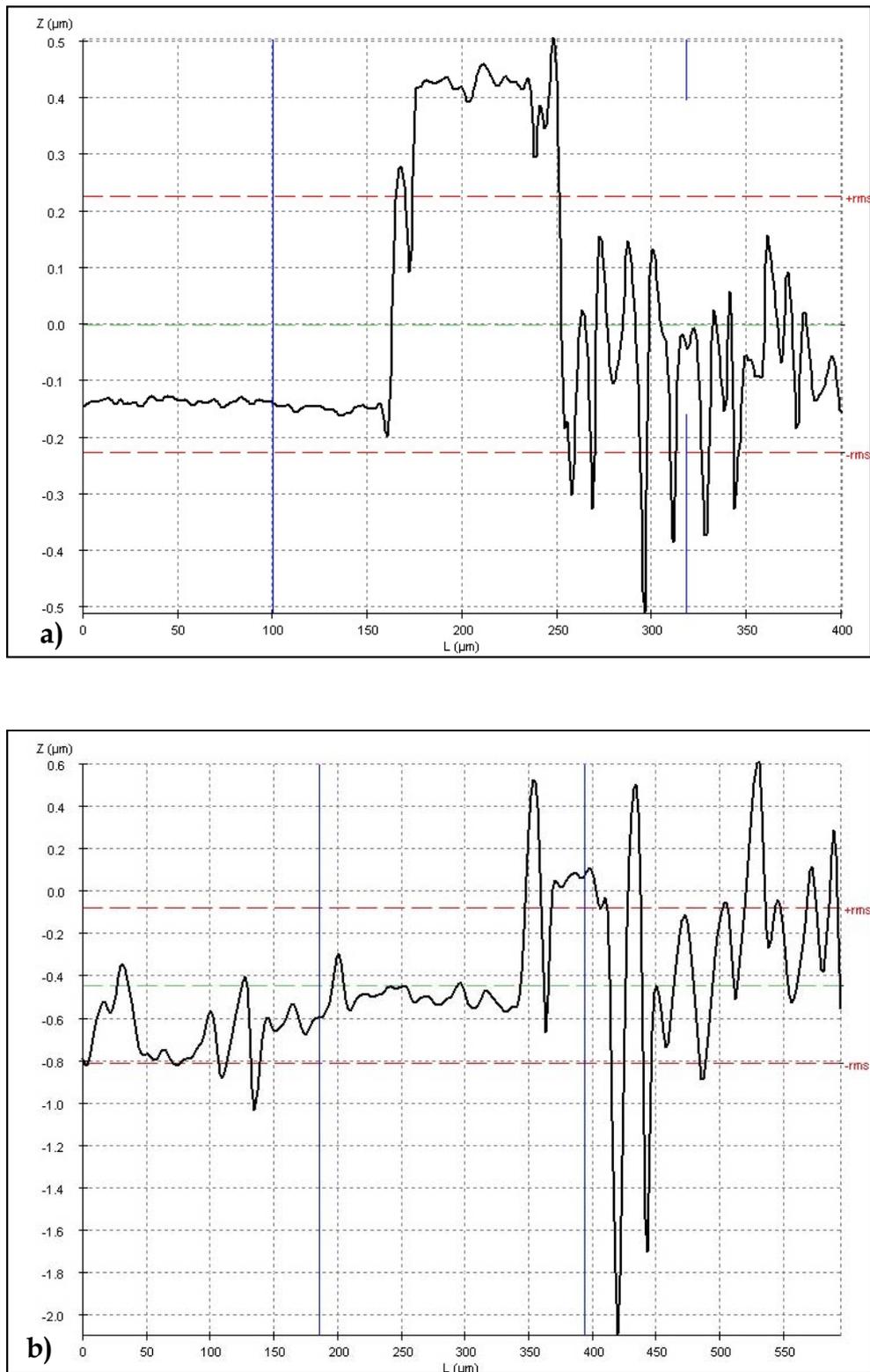
**Figura V.4.14:** Fotografías de un electrodo de óxido de iridio antes (a) y después (b) de la sobreoxidación.

#### V.4.2.2.- Pseudo-referencias basados en óxido de plata.

La plata depositada mediante técnicas de metalización se oxidó mediante voltamperometría cíclica, realizada hasta cuatro potenciales finales diferentes (sección V.3.2.2).

Durante el proceso de oxidación del electrodo es de esperar que se produzca un cambio en su superficie, por lo que se realizaron diferentes medidas de la rugosidad de la superficie antes y después de cada uno de los procesos de oxidación de la plata.

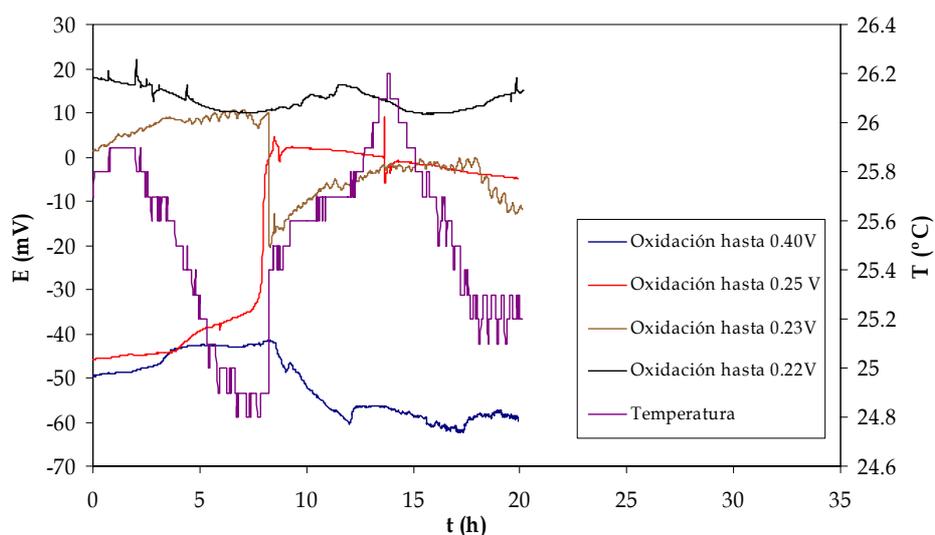
En la figura V.4.15 se muestran los perfiles de la superficie de un electrodo antes y después de la oxidación.



**Figura V.4.15:** Perfiles de un electrodo de plata antes de oxidar (a) y después (b) de la oxidación.

Como puede observarse, la rugosidad aumenta sustancialmente una vez que la superficie ha sido oxidada. De la misma manera el grosor de la capa también aumenta, de los 200 nm, aproximadamente de la capa de plata depositada (Fig. V.4.15 a) hasta 600 nm de la plata ya oxidada (Fig. V.4.15 b).

Se comprobó la estabilidad y la deriva de los pseudo referencias basados en óxido de plata, registrándose medidas de potencial entre los diferentes electrodos fabricados respecto un electrodo de referencia comercial en una solución de  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato pH 7 (Fig. V.4.16). Previamente a la realización de este experimento, estos electrodos estuvieron sumergidos en esta misma solución durante 24 horas.



**Figura V.4.16:** Potenciometría de diferentes electrodos de pseudo-referencia basado en óxido de plata en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato a pH 7.

Los resultados obtenidos para los electrodos basados en óxidos metálicos, tanto óxido de plata como óxido de iridio, ponen de manifiesto que este tipo de electrodos fabricados con los métodos descritos en las secciones anteriores no son adecuados para su utilización como electrodos de pseudo-referencia, ya que su potencial no es estable, puesto que se producen derivas

de potencial entre 10 y 30 mV. Esto generaría grandes cambios en la intensidad recogida por el electrodo de trabajo de un sensor amperométrico.

## V.- Bibliografía.

- [1] H.H. Weetall, *Biosensors and Bioelectronics*, **1996**, 11, i-iv.
- [2] C.o.C.T. IUPAC. *Reference electrode*. [En línea] 1997 02/11/05 [cited 2006 10/06/06]; Available from: <http://www.iupac.org/goldbook/I03106.pdf>.
- [3] A. Simonis, H. Luth, J. Wang y M.J. Schoning, *Sensors*, **2003**, 3, 330-339.
- [4] D.J. Ives y G.J. Janz, in *Reference Electrodes, Theory and Practice*, New York, **1961**.
- [5] A.W.J. Cranny y J.K. Atkinson, *Measurement Science & Technology*, **1998**, 9, 1557-1565.
- [6] H. Suzuki, *ELECTROANALYSIS*, **2000**, 12, 703-715.
- [7] A. Errachid, J. Bausells y N. Jaffrezic-Renault, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1999**, 60, 43-48.
- [8] A. Simonis, H. Luth, J. Wang y M.J. Schoning, *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2004**, 103, 429-435.
- [9] H.S. Yang, S.K. Kang, C.A. Choi, H. Kim, D.H. Shin, Y.S. Kim y Y.T. Kim, *Lab on a Chip*, **2004**, 4, 42-46.
- [10] O.C. Keller y J. Buffle, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 936-942.
- [11] K. Kuwabara y Y. Noda, *Solid State Ionics*, **1993**, 61, 303-308.
- [12] M. Wang, S. Yao y M. Madou, *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2002**, 81, 313-315.
- [13] R.K. Jaworski, J.A. Cox y B.R. Strohmeier, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1992**, 325, 111-123.
- [14] L.D. Burke, J.K. Mulcahy y D.P. Whelan, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1984**, 163, 117-128.
- [15] S. Yao, M. Wang y M. Madou, *Journal of the Electrochemical Society*, **2001**, 148, H29-H36.
- [16] M.J. Schoning, A. Simonis, T. Krings, H. Luth y J. Wang, *Electroanalysis*, **2002**, 14, 955-958.

- [17] D. Desmond, B. Lane, J. Alderman, J.D. Glennon, Dermot Diamond y D.W.M. Arrigan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1997**, *44*, 389-396.
- [18] General Purpose Electrochemical System for Windows, Version 4.9, EcoChemie B.V., Utrecht, Holanda, **2002**.
- [19] M. Schlesinger y M. Paunovic, in *Modern Electroplating*. Wiley, New York, **2000**.
- [20] X. Jin, J. Lu, P. Liu y H. Tong, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2003**, *542*, 85-96.
- [21] P.J. Kinlen, J.E. Heider y D.E. Hubbard, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1994**, *22*, 13-25.
- [22] E.M. Tejada-Rosales, N. Casan-Pastor y P. Gomez-Romero, *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*, **2004**, *43*, 220-223.

TERCERA PARTE, APLICACIONES ANALÍTICAS.

---

---

VI.- DETERMINACIÓN DE GLUCOSA UTILIZANDO MICROCHIPS  
AMPEROMÉTRICOS.

---

---

## VI.- Objetivos.

- ✓ Estudiar la viabilidad de un biosensor basado en los enzimas Horse Radish peroxidasa y Glucosa oxidasa para la determinación de glucosa, empleando chips de platino como transductores y distintos mediadores.
- ✓ Optimizar las variables o parámetros experimentales que afectan a la variable respuesta.
- ✓ Comparar la estabilidad operacional de los biosensores contruidos utilizando distintos mediadores, así como su reproducibilidad y repetibilidad.
- ✓ Determinar cronoamperométricamente glucosa en muestras reales, utilizando el biosensor más adecuado de los desarrollados.

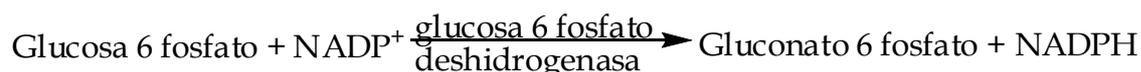
## **VI.1.- Introducción.**

La industria alimentaria es uno de los sectores que requiere un control de calidad más estricto, evaluando la composición y frescura de los alimentos, por lo que se necesita una instrumentación capaz de realizar análisis en el menor tiempo y a bajo coste. Este hecho es especialmente importante en el sector vitivinícola, ya que un gran número de pequeños productores domina el sector.

Existen diferentes parámetros para determinar tanto la calidad del vino como del mosto, entre los que caben destacar azúcares, etanol, polifenoles, ácido glucónico, ácido málico, etc.

La glucosa y la fructosa, que representan un 99% de los azúcares presentes en la uva al final de su maduración, se determinan habitualmente mediante refractrometría o mediante su reducción empleando una solución alcalina de sales de cobre (II) [1]. En ninguno de los casos es posible cuantificar la concentración de glucosa y fructosa por separado, aunque la estimación individual de estos parámetros es muy importante durante el proceso de fermentación, así como en el mosto y en el producto final [2].

Actualmente, existen diferentes métodos oficiales para la determinación de glucosa. El más utilizado se basa en la serie de reacciones enzimáticas en cadena que se presentan a continuación,



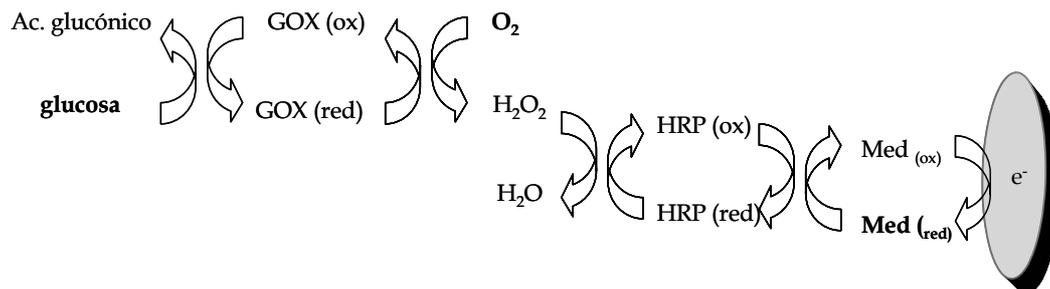
La cantidad de NADPH formada mediante la reacción enzimática, proporcional a la concentración de glucosa, es cuantificada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm [3]. Este método es largo y costoso, ya que los enzimas sólo pueden ser utilizados una vez y se necesita personal especializado para realizar el ensayo.

El empleo de biosensores, debido a las características descritas en el capítulo II, es una buena alternativa a estos métodos oficiales para la determinación de glucosa en mostos y vinos.

En este capítulo se describe la fabricación de biosensores para la determinación de glucosa, su caracterización y su posterior aplicación en muestras reales.

El material biológico fue inmovilizado sobre los chips amperométricos fabricados mediante tecnología microelectrónica de silicio, descritos en el capítulo III. Como se comentó con anterioridad, este tipo de transductores permite utilizar cantidades mínimas de reactivos, especialmente de enzimas, lo que abarata considerablemente el coste de los análisis, presentándose como una clara alternativa ante los tradicionales.

Se diseñaron sensores bienzimáticos de segunda generación basados en los enzimas glucosa oxidasa (GOx) y Horse Radish peroxidasa (HRP), para determinar la glucosa presente tanto en muestras sintéticas como en mostos, según el esquema que se presenta en la figura VI.1.1.



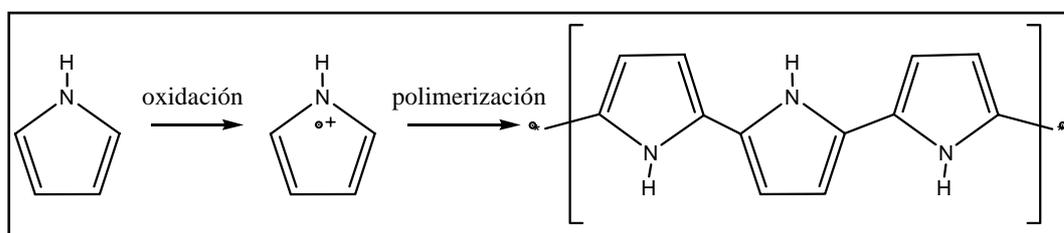
**Figura VI.1.1:** Mecanismos de detección del sensor bienzimático.

La reacción enzimática implica la intervención de un mediador, que facilita el intercambio electrónico entre el centro activo del enzima y el electrodo. Se emplearon dos mediadores diferentes, ferrocianuro ( $FeCN$ ) y Meldola's blue (MB), ambos muy empleados en la fabricación de biosensores de segunda generación [4-9], para realizar el seguimiento de esta reacción.

La inmovilización enzimática es uno de los procesos críticos en la fabricación de biosensores. En este caso, los enzimas se inmovilizaron mediante atrapamiento (Sección II.1.4.) a través de la electrodeposición de un polímero conductor, como es el pirrol (Py). Este tipo de polímeros facilitan la transferencia electrónica entre el enzima y la superficie del electrodo [10], minimizan la pérdida de actividad enzimática intrínseca a los métodos de inmovilización y actúan a su vez como membrana selectiva ante ciertos contaminantes presentes en la muestra [11].

La utilización de polímeros conductores es muy útil en la inmovilización enzimática sobre microtransductores, ya que permite dirigir de una manera muy simple la formación de la capa polimérica sobre superficies de tamaño reducido [12].

El monómero de Py es capaz de oxidarse sobre el electrodo de trabajo aplicando potenciales superiores a 0.6 V de acuerdo con el esquema mostrado en la figura VI.1.2.



**Figura VI.1.2:** Polimerización de pirrol.

Existen diferentes métodos para la electrodeposición descritos en la bibliografía [12-15]. En el presente trabajo se ha seguido el procedimiento descrito por Alonso y colab. [16]. El pirrol, en solución acuosa y en presencia de  $\text{LiClO}_4$ , es oxidado mediante barridos cíclicos entre 0 y 0.8 V. La forma oxidada del pirrol está cargada positivamente, por tanto, necesita un anión para mantener la electroneutralidad [17]. Durante este proceso de polimerización los enzimas, GOx y HRP, y el mediador empleado son atrapados sobre la superficie del transductor.

## VI.2.- Experimental

### VI.2.1.- Reactivos, equipos y software.

Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie, BV, Holanda). Los transductores utilizados han sido fabricados en la sala blanca del Centro Nacional de Microelectrónica según se describe en la sección III.4.

Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System [18] (GPES). El análisis de datos y la optimización de las variables se realizó utilizando STATGRAPHICS PLUS para el diseño de experimentos [19] y PROGRESS para las regresiones lineales [20].

Todas las medidas electroquímicas se realizaron frente a un electrodo de referencia Ag/AgCl 3 mol dm<sup>-3</sup> (Crison, Barcelona, España).

Se utilizaron reactivos de grado analítico sin purificación adicional. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada ultrapura (18MΩ cm).

Las disoluciones de GOx (EC.1.1.3.4, Sigma, Steinheim, Alemania), HRP (EC. 1.11.1.7, Sigma, Steinheim, Alemania), Py (Sigma, Steinheim, Alemania), LiClO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, España), MB (Sigma, Steinheim, Alemania) y K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Panreac, Barcelona, España) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada uno de ellos en agua desionizada. Como electrolito soporte se empleó 0.05 mol dm<sup>-3</sup> tampón fosfato (Panreac, Barcelona, España) pH 7, 0.1 mol dm<sup>-3</sup> KCl (Panreac, Barcelona, España).

El pH de las disoluciones se cuantificó con un pHmetro Crison GLP 22 (Barcelona, España).

Las disoluciones de glucosa (Panreac, Barcelona, España) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de D-glucosa (Sigma, Steinheim, Alemania) en electrolito soporte.

### **VI.2.2.- Modificación del electrodo de trabajo.**

La inmovilización enzimática durante la electrogeneración de una matriz de polipirrol (PPy) ofrece distintas posibilidades, fácilmente controlables. Así, podrían depositarse los enzimas de uno en uno o simultáneamente. De igual manera, el mediador puede incorporarse conjuntamente con los enzimas o en una capa diferente. El número de ciclos registrados durante los voltamperogramas cíclicos en la formación del polímero determina la cantidad de PPy formado y, consecuentemente, la de enzimas o mediador atrapado.

Se realizaron experimentos previos con el objetivo inicial de estudiar diferentes posibilidades de atrapamiento enzimático en PPy [21]. El protocolo de inmovilización que condujo a mejores resultados se describe a continuación.

#### **Activación del electrodo.**

Antes de cada electropolimerización, la superficie del electrodo de trabajo se activó electroquímicamente de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo III.

Básicamente, esta etapa consiste en la realización de voltamperogramas cíclicos, en una solución  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl, entre  $-1.2 \text{ V}$  y  $-2.2 \text{ V}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  generando hidrógeno gas sobre la superficie del electrodo, eliminando las partículas adheridas y consiguiendo así su activación.

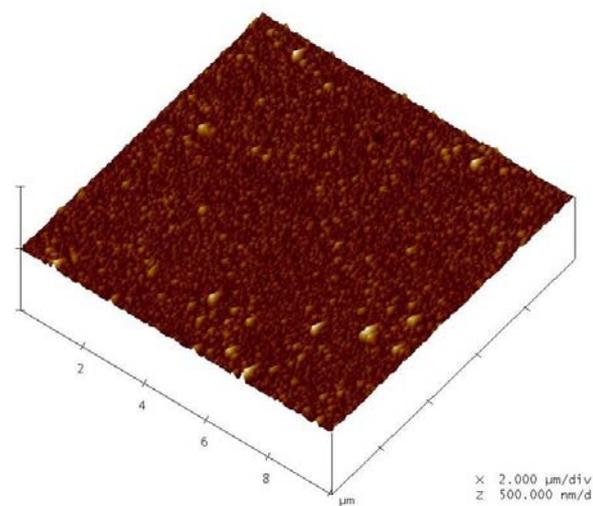
Este proceso se repite hasta que se consigue un voltamperograma cíclico típico de una disolución de ferrocianuro (Véase sección III.5).

### **Electropolimerización de una precapa de pirrol y del mediador.**

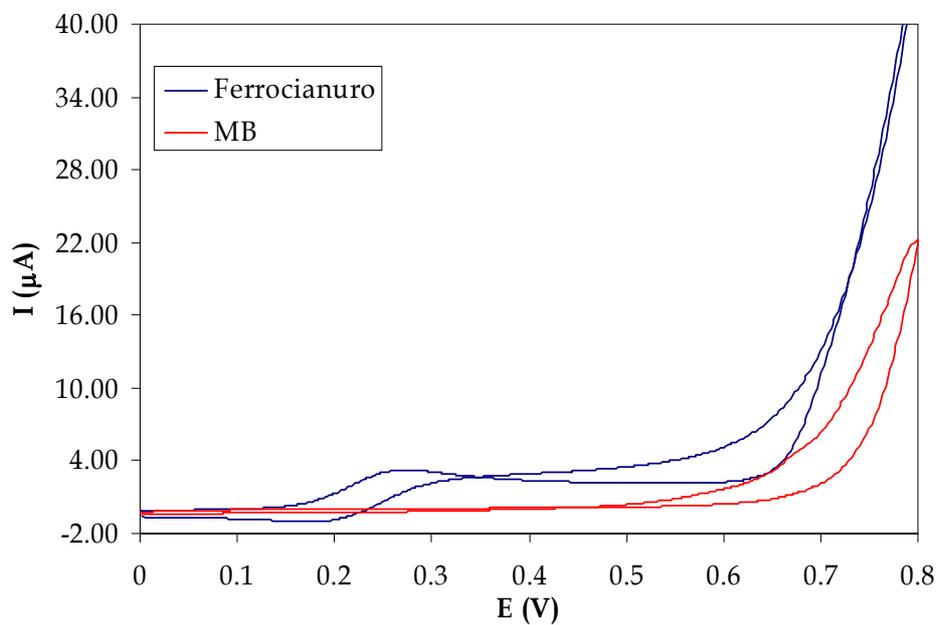
Los mejores resultados se obtuvieron al depositar una precapa de PPy previa a la formación de la membrana enzimática, para facilitar su adhesión sobre el electrodo de trabajo.

Con este fin, se introdujo el microsensor amperométrico en una solución acuosa  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{LiClO}_4$  y  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de Py, y se realizó un barrido cíclico de potencial entre  $0 \text{ V}$  y  $0.8 \text{ V}$  a una velocidad de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (Fig. VI.2.1).

Los mediadores utilizados, FeCN y MB, fueron inmovilizados sobre el electrodo en el proceso de formación de esta precapa (Fig. VI.2.2.). En ambos casos, la cantidad adecuada de cada uno de ellos fue añadida a la solución de pirrol utilizada. Cabe destacar que en el caso de la utilización de MB como mediador, es necesario realizar la disolución de PPy,  $\text{LiClO}_4$  y MB en una solución acuosa con un 16% de metanol, con el fin de facilitar su disolución.



**Figura VI.2.1:** *Imagen de espectroscopía de fuerzas atómicas de un chip de platino modificado con una capa de polipirrol*

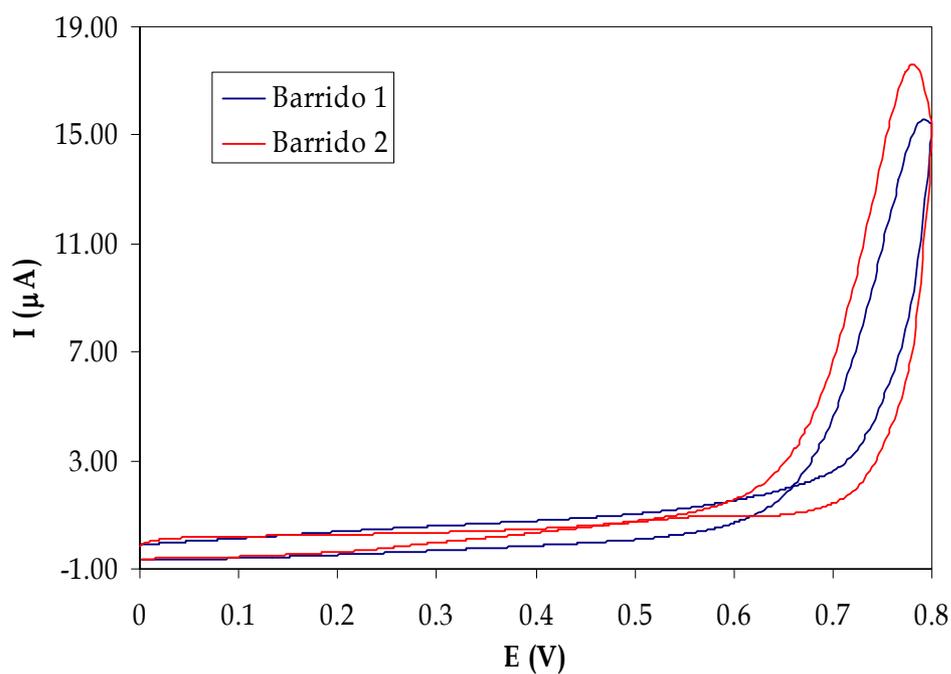


**Figura VI.2.2:** *Voltamperogramas cíclicos correspondientes a la formación de la precapa de polipirrol, en la que se inmoviliza a su vez el mediador correspondiente, ferrocianuro o MB. Velocidad de barrido, 10 mV s<sup>-1</sup>.*

### Inmovilización de los enzimas.

A continuación, se depositaron dos capas de PPy donde fueron inmovilizados simultáneamente los enzimas GOx y HRP, en las concentraciones requeridas de acuerdo al diseño de experimentos que se describe posteriormente.

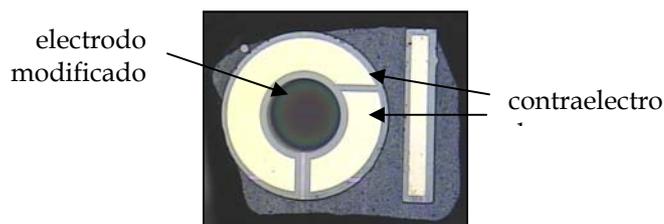
Para ello, se sumergió el transductor con el electrodo de trabajo modificado por la precapa, en una solución acuosa  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{LiClO}_4$ ,  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de Py y de cada uno de los enzimas. Se registraron dos voltamperogramas cíclicos entre 0 V y 0.8 V, a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (Fig. VI.2.3)



**Figura VI.2.3:** Voltamperogramas cíclicos correspondientes a la inmovilización enzimática. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Conservación del biosensor.

Una vez finalizado el proceso de inmovilización enzimática, el biosensor (Fig. VI.2.4) fue guardado hasta su utilización en electrolito soporte a 4 °C



**Figura VI.2.4:** Imagen de un sensor bienzimático basado en PPy.

En la determinación electroquímica de glucosa, la superficie del electrodo modificado puede contaminarse fácilmente con restos de analito o productos de la reacción enzimática. Con el fin de conseguir unas medidas repetitivas, la superficie del electrodo se regeneró entre los distintos calibrados en una solución agitada 0.05 mol dm<sup>-3</sup> de tampón fosfato pH 7, 0.1 mol dm<sup>-3</sup> KCl durante 15 minutos. De esta manera, los posibles restos atrapados en la membrana de PPy pasan a la solución de limpieza.

## **VI.3.- Optimización de las variables experimentales.**

La respuesta amperométrica de los biosensores de segunda generación es función de parámetros tales como el potencial aplicado, la concentración enzimática o la concentración de mediador.

La optimización de estas variables es una de las etapas más importantes en el desarrollo de los biosensores. Generalmente, se realiza factor a factor, registrando los cambios producidos en la variable respuesta ante modificaciones controladas de una de las variables en presencia de valores constantes de las restantes. Esta metodología no es eficiente y suele ser muy costosa [22].

En el presente trabajo, la optimización de las variables se realizó mediante la metodología del diseño de experimentos, que permite la optimización de todos los factores al mismo tiempo, teniendo en cuenta también la influencia de sus interacciones en la variable respuesta [23].

### **VI.3.1.- Meldola's blue como mediador.**

En el caso del sensor bienzimático en el que se utiliza MB como mediador, los factores optimizados fueron el potencial aplicado ( $E_{ap}$ ) y las concentraciones de mediador ( $C_{MB}$ ) y Py ( $C_{Py}$ ) utilizadas para modificar la superficie del electrodo. La concentración de Py determina la cantidad de polímero que se genera en la superficie del electrodo y, consecuentemente, la cantidad de enzimas inmovilizados en la superficie del electrodo, que indudablemente afecta a la variable respuesta. Las concentraciones de  $LiClO_4$

y Py, así como las de los enzimas, se mantuvieron en una relación constante 2:1 y 1:1, respectivamente, durante toda la optimización [16].

La influencia de estas tres variables experimentales en la respuesta se estudió a través de un diseño central compuesto  $2^3$ . Consta de 14 experimentos, correspondientes a todas las posibles combinaciones entre los niveles de cada factor, y de tres réplicas en el punto central, necesarias para estimar el valor residual.

Los valores correspondientes a los niveles alto (+), bajo (-) y al punto central (0) para cada factor fueron los siguientes,

$$\begin{array}{lll} E_{ap} (+) = 0.1 \text{ V} & C_{MB} (+) = 4.0 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{Py} (+) = 0.07 \text{ mol dm}^{-3} \\ E_{ap} (-) = -0.3 \text{ V} & C_{MB} (-) = 1.3 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{Py} (-) = 0.03 \text{ mol dm}^{-3} \\ E_{ap} (0) = -0.1 \text{ V} & C_{MB} (0) = 2.65 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{Py} (0) = 0.05 \text{ mol dm}^{-3} \end{array}$$

En la elección de dichos niveles se procuró trabajar en el mayor intervalo experimental razonable, teniendo en cuenta las características del proceso de reducción abordado. Así, potenciales muy positivos no son explorables debido a la sobreoxidación del polipirrol, que implicaría la incorporación de grupos con oxígeno a su estructura, así como la pérdida de la carga catiónica del mismo y por tanto, su capacidad conductora [24-26]. En el caso del mediador y del pirrol, concentraciones muy elevadas impidieron la disolución del primero y dificultaron la formación del polímero.

El diseño así construido recorre cinco niveles para cada uno de los factores (Fig. VII.3.1.), con lo que se estudia un considerable intervalo de los mismos.

Los valores de cada una de las variables en los distintos experimentos de este diseño se presentan en la tabla VI.3.1.

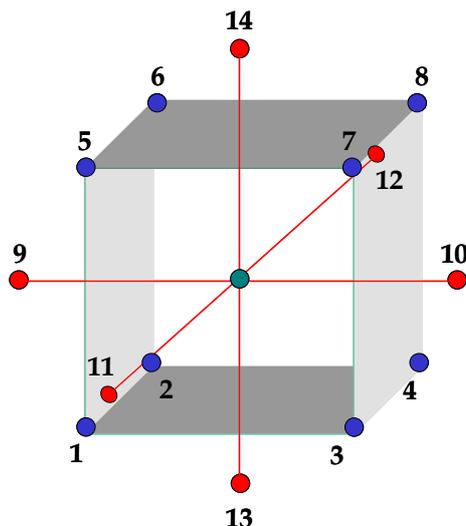


Figura VII.1.3.1.: Puntos experimentales de un diseño central compuesto de tres factores.

Tabla VI.3.1.: Puntos del diseño central compuesto  $2^3$  para la optimización de los parámetros experimentales en un sensor bienzimático para la determinación de glucosa empleando MB como mediador ( $C_{GLUC} = 1.9 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

| $E_{ap}$ (V) | $C_{MB}$ (mmol $\text{dm}^{-3}$ ) | $C_{Py}$ (mmol $\text{dm}^{-3}$ ) |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| -0.30        | 1.30                              | 0.030                             |
| 0.10         | 1.30                              | 0.030                             |
| -0.30        | 4.00                              | 0.030                             |
| 0.10         | 4.00                              | 0.030                             |
| -0.30        | 1.30                              | 0.070                             |
| 0.10         | 1.30                              | 0.070                             |
| -0.30        | 4.00                              | 0.070                             |
| 0.10         | 4.00                              | 0.070                             |
| -0.44        | 2.65                              | 0.050                             |
| 0.24         | 2.65                              | 0.050                             |
| -0.10        | 0.38                              | 0.050                             |
| -0.10        | 4.92                              | 0.050                             |
| -0.10        | 2.65                              | 0.016                             |
| -0.10        | 2.65                              | 0.084                             |
| -0.10        | 2.65                              | 0.050                             |
| -0.10        | 2.65                              | 0.050                             |
| -0.10        | 2.65                              | 0.050                             |

Los resultados obtenidos se presentan en forma de ANOVA en la Tabla VI.3.2.

**Tabla VI.3.2:** ANOVA de los datos obtenidos mediante la metodología de diseño de experimentos.

S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados;  $F_{exp} = MC_{factor}/MC_{error}$ ;  $P_{actual}$ , nivel de probabilidad;

\* Factores significativos a  $\alpha = 0.05$ .

| <b>Efecto</b>       | <b>S.C.</b> | <b>G.L.</b> | <b>M.C.</b> | <b>F<sub>exp</sub></b> | <b>P<sub>actual</sub></b> |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|---------------------------|
| A : E <sub>ap</sub> | 1.902       | 1           | 1.90        | 5.710                  | 0.1395                    |
| B: C <sub>MB</sub>  | 0.608       | 1           | 0.61        | 1.820                  | 0.3093                    |
| C: C <sub>Py</sub>  | 0.949       | 1           | 0.95        | 2.850                  | 0.2336                    |
| AA                  | 9.634       | 1           | 9.63        | 28.90                  | <b>0.0329*</b>            |
| AB                  | 0.180       | 1           | 0.18        | 0.540                  | 0.5389                    |
| AC                  | 1.620       | 1           | 1.62        | 4.860                  | 0.1583                    |
| BB                  | 2.923       | 1           | 2.92        | 8.770                  | 0.0976                    |
| BC                  | 0.180       | 1           | 0.18        | 0.540                  | 0.5389                    |
| CC                  | 13.192      | 1           | 13.19       | 39.58                  | <b>0.0243*</b>            |
| Fallo de ajuste     | 5.302       | 5           | 1.06        | 3.180                  | 0.2563                    |
| Error puro          | 0.667       | 2           | 0.33        |                        |                           |
| Total (corr)        | 41.296      | 16          |             |                        |                           |

$$R^2 = 0.8554$$

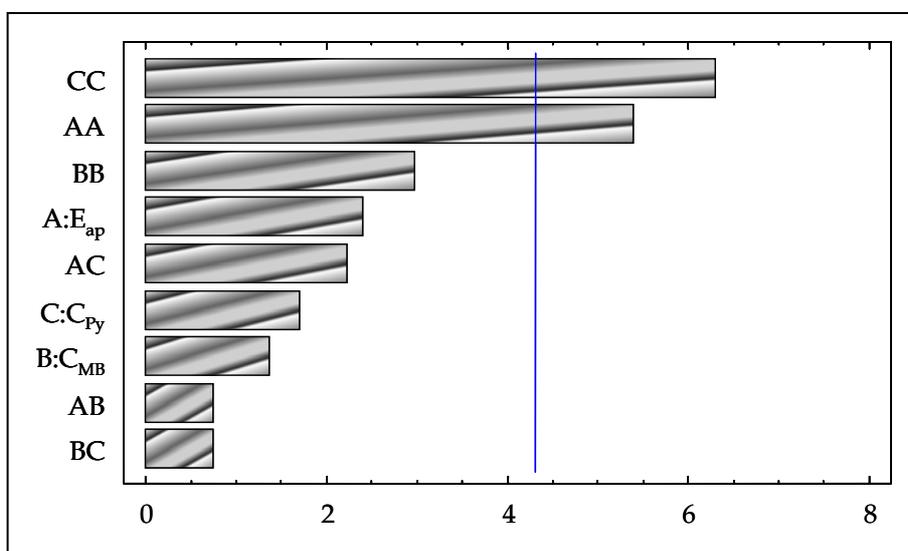
Dicho análisis divide la variabilidad de la variable respuesta en fragmentos individuales para cada efecto y, seguidamente, analiza el significado estadístico de cada uno, comparando la media de cuadrados con una estimación del error experimental.

Para establecer si los efectos son o no significativos se realiza un test, cuyas hipótesis nula y alternativa son,

- $H_0$ , no existe efecto del factor.
- $H_a$ , existe efecto del factor.

siendo su región crítica,  $F_{exp} > F_{tab}$ . El valor  $F_{exp}$  se obtiene al dividir la suma de cuadrados de cada efecto (SC) entre la suma de cuadrados del error ( $SC_E$ ), mientras que el valor de  $F_{tab}$  depende tanto del nivel de significación como de los grados de libertad del efecto y del error. En muchas ocasiones se muestra el valor de  $P_{actual}$ , en la tabla de la ANOVA, en lugar de  $F_{tab}$ , ya que ambos están relacionados.

Puede observarse, que tanto el potencial aplicado como la concentración de Py (Fig. VI.3.2.) influyen en la variable respuesta a través de su interacción cuadrática ( $P_{actual} < 0.05$ ). En el caso de la concentración de mediador, ninguno de los efectos relacionados influye significativamente en la intensidad, por tanto, se fijó este factor en el valor correspondiente al óptimo dado por STATGRAPHICS,  $0.38 \text{ mmol dm}^{-3}$ .



**Figura VI.3.2:** Diagrama de Pareto para la variable respuesta, utilizando el biosensor construido con MB como mediador.

El modelo seleccionado es adecuado para modelar los datos, ya que no existe fallo de ajuste ( $P_{\text{actual}} > 0.05$ ) a un nivel de confianza del 95 %.

En la figura VI.3.3 se muestra la superficie de respuesta generada para las variables significativas, fijando la concentración de mediador en su valor óptimo. Puede observarse un máximo claramente definido para un potencial aplicado de  $-0.017\text{ V}$  frente a un electrodo de referencia  $\text{Ag}/\text{AgCl}$   $3\text{ mol dm}^{-3}$  y una concentración de pirrol en la solución utilizada para modificar la superficie electródica de  $0.056\text{ mmol dm}^{-3}$ .

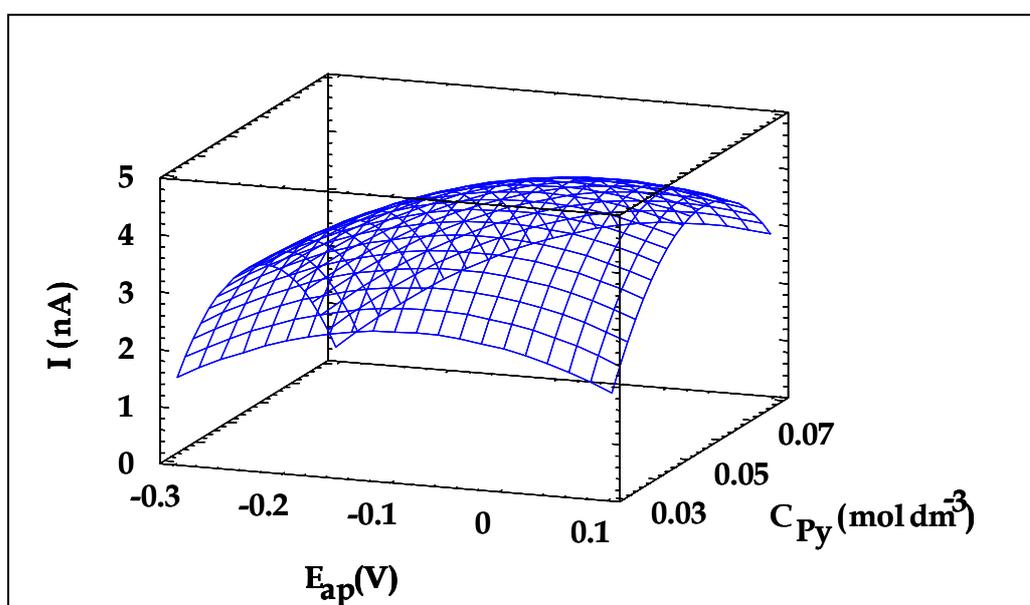


Figura VII.3.3: Superficie de respuesta en la optimización de las variables experimentales.

$$C_{MB} = 0.38\text{ mmol dm}^{-3}.$$

A partir de este proceso de optimización se seleccionaron los siguientes valores de las variables experimentales para el sensor bienzimático para la determinación de glucosa,

$$E_{ap} = -0.017\text{ V} \quad C_{MB} = 0.38\text{ mmol dm}^{-3} \quad C_{Py} = 0.056\text{ mol dm}^{-3}$$

### VII.3.2.- Ferrocianuro como mediador.

Se construyó un nuevo biosensor para la determinación de glucosa, basado en los enzimas HRP y GOx, utilizando FeCN como mediador inmovilizado en la precapa.

La optimización de las variables siguió el mismo procedimiento que en la sección VI.3.1. En este caso, experiencias previas mostraron que el único potencial al que el biosensor respondía ante adicciones de glucosa era  $-0.1$  V. Por tanto, esta variable experimental se fijó en este valor y con el objeto de continuar con una optimización análoga a la anterior, se incluyó en el diseño la concentración de enzimas ( $C_{\text{Enz}}$ ).

Los valores seleccionados para los diferentes niveles de cada uno de los factores fueron,

$$\begin{array}{lll}
 C_{\text{Ez}} (+) = 0.08 \text{ \% (m/v)} & C_{\text{Fe}} (+) = 9 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{\text{Py}} (+) = 0.058 \text{ mol dm}^{-3} \\
 C_{\text{Ez}} (-) = 0.04 \text{ \% (m/v)} & C_{\text{Fe}} (-) = 5 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{\text{Py}} (-) = 0.017 \text{ mol dm}^{-3} \\
 C_{\text{Ez}} (0) = 0.06 \text{ \% (m/v)} & C_{\text{Fe}} (0) = 7 \text{ mmol dm}^{-3} & C_{\text{Py}} (0) = 0.037 \text{ mol dm}^{-3}
 \end{array}$$

La optimización de estos tres factores se realizó con un diseño central compuesto  $2^3$ , cuantificando la intensidad registrada para una solución  $9.8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  D-glucosa. Tanto la relación entre concentraciones de Py:LiClO<sub>4</sub> como de enzimas se fijó en 1:2 y 1:1, respectivamente.

Los valores de los parámetros experimentales en cada punto del diseño se presentan en la tabla VI.3.3.

**Tabla VII.3.3:** *Diseño central compuesto 2<sup>3</sup> para la optimización de los parámetros experimentales en la determinación de glucosa mediante un sensor bienzimático, empleando FeCN como mediador.*

| $C_{Py}$ (mmol dm <sup>-3</sup> ) | $C_{Fe}$ (mmol dm <sup>-3</sup> ) | $C_{Ez}$ (% m/v) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| 0.017                             | 0.005                             | 0.040            |
| 0.058                             | 0.005                             | 0.040            |
| 0.017                             | 0.009                             | 0.040            |
| 0.058                             | 0.009                             | 0.040            |
| 0.017                             | 0.005                             | 0.080            |
| 0.058                             | 0.005                             | 0.080            |
| 0.017                             | 0.009                             | 0.080            |
| 0.058                             | 0.009                             | 0.080            |
| 0.003                             | 0.007                             | 0.060            |
| 0.072                             | 0.007                             | 0.060            |
| 0.038                             | 0.004                             | 0.060            |
| 0.038                             | 0.010                             | 0.060            |
| 0.038                             | 0.007                             | 0.026            |
| 0.038                             | 0.007                             | 0.094            |
| 0.038                             | 0.007                             | 0.060            |
| 0.038                             | 0.007                             | 0.060            |
| 0.038                             | 0.007                             | 0.060            |

El análisis de los efectos puede realizarse a partir del análisis de la varianza (ANOVA) de la tabla VI.3.4. y del diagrama de Pareto que se muestra en la figura VI.3.4.

El único factor significativo obtenido fue la concentración de Py, puesto que lo es el efecto de su interacción al cuadrado ( $P_{actual} < 0.05$ ) a un nivel de confianza del 95%. Tanto la concentración de FeCN como la de enzimas se fijaron en los valores óptimos dados por STATGRAPHICS, 7 mmol dm<sup>-3</sup> y 0.056 %, respectivamente.

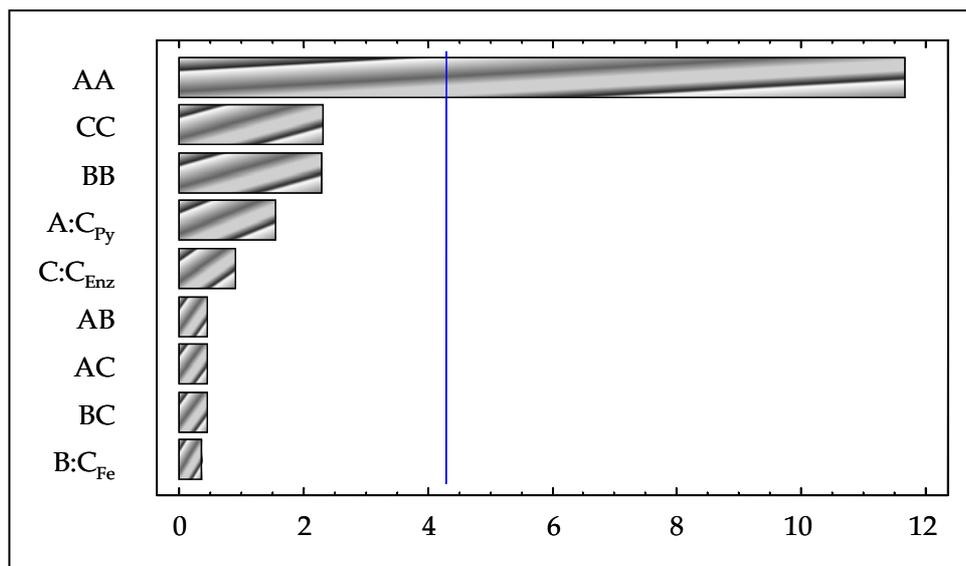
**Tabla VI.3.4:** ANOVA de los datos obtenidos mediante la metodología de diseño de experimentos.

S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados;  $F_{exp} = MC_{factor}/MC_{error}$ ;  $P_{actual}$ , nivel de probabilidad;

\* Factores significativos a  $\alpha = 0.05$ .

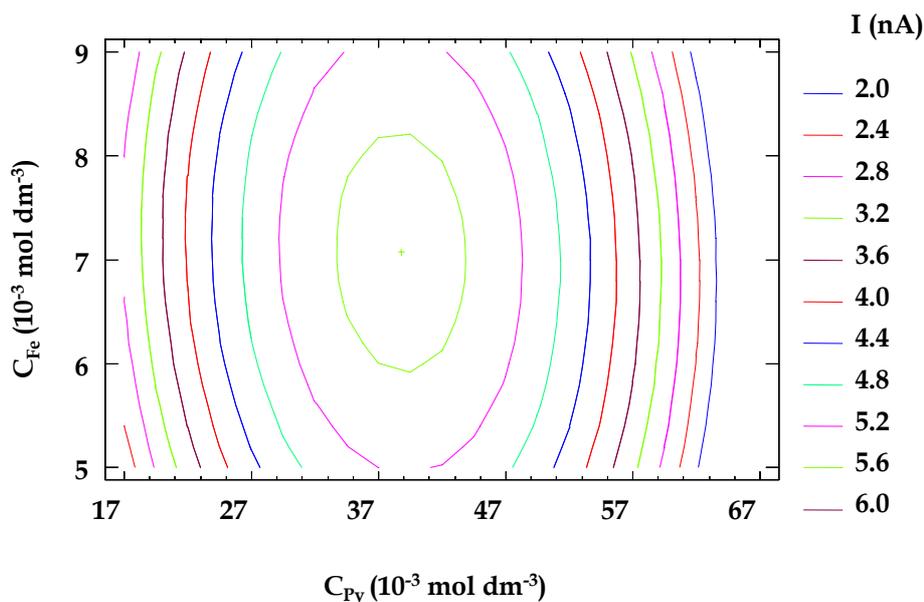
| Efecto              | S.C.    | G.L. | M.C. | F <sub>exp</sub> | P <sub>actual</sub> |
|---------------------|---------|------|------|------------------|---------------------|
| A : C <sub>Py</sub> | 1.300   | 1    | 1.30 | 2.350            | 0.2647              |
| B: C <sub>Fe</sub>  | 0.059   | 1    | 0.06 | 0.110            | 0.7743              |
| C: C <sub>Ez</sub>  | 0.420   | 1    | 0.42 | 0.760            | 0.4750              |
| AA                  | 75.036  | 1    | 75.0 | 135.84           | <b>0.0073*</b>      |
| AB                  | 0.101   | 1    | 0.10 | 0.180            | 0.7103              |
| AC                  | 0.101   | 1    | 0.10 | 0.180            | 0.7103              |
| BB                  | 2.830   | 1    | 2.83 | 5.120            | 0.1519              |
| BC                  | 0.101   | 1    | 0.10 | 0.180            | 0.7103              |
| CC                  | 2.910   | 1    | 2.91 | 5.270            | 0.1486              |
| Fallo de ajuste     | 46.298  | 5    | 9.26 | 16.760           | 0.0573              |
| Error puro          | 1.105   | 2    | 0.55 |                  |                     |
| Total (corr)        | 125.857 | 16   |      |                  |                     |

$$R^2 = 0.8233$$



**Figura VII.3.4:** Diagrama de Pareto para la variable respuesta, utilizando el biosensor construido con FeCN como mediador.

En la figura VI.3.5 se muestran las curvas de nivel de la intensidad en función de la concentración de mediador y de Py, para una concentración enzimática de 0.056 %. Se observa un máximo de intensidad claramente definido para una concentración de pirrol de  $0.039 \text{ mol dm}^{-3}$  y  $7 \text{ mmol dm}^{-3}$  de mediador.



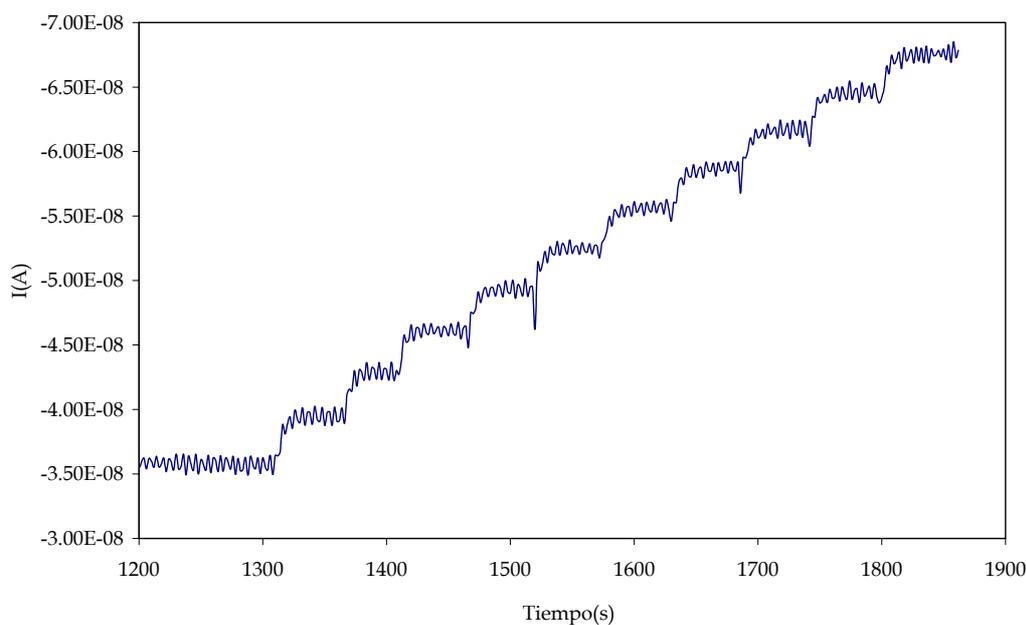
**Figura VI.3.5:** Curvas de nivel para la variable respuesta obtenidas para el valor correspondiente a 0.056 % (m/v) de enzimas.

A partir del proceso de optimización realizado, se seleccionaron los siguientes valores de las variables experimentales para el sensor bienzimático para la determinación de glucosa empleando ferrocianuro como mediador (Fig. VI.3.6),

$$C_{Ez} = 0.056 \% \text{ (m/v)}$$

$$C_{Fe} = 7 \text{ mmol dm}^{-3}$$

$$C_{Py} = 0.039 \text{ mol dm}^{-3}$$



**Figura VI.3.6:** *Cronoamperograma registrado en las condiciones óptimas para la determinación de glucosa mediante el HRP-GOx-biosensor utilizando FeCN como mediador. Cada adición corresponde a 200  $\mu$ l de una disolución 0.05 mol  $dm^{-3}$  de glucosa.*

## VI.1.4.- Estabilidad de los biosensores

El tiempo de vida de un biosensor enzimático está influenciado por el método de almacenamiento de éste y por su estabilidad operacional. Esta estabilidad depende, en gran medida, de la pérdida de actividad enzimática, de la pérdida de propiedades conductoras de la capa de PPy y de la disminución de la cantidad de enzimas y/o mediador atrapado en la membrana por su difusión a la solución. La contaminación de la superficie del electrodo por sustancias orgánicas que bloquean el acceso del analito al centro activo de los enzimas influye también en el tiempo de vida del biosensor.

A continuación se describen los estudios realizados con cada uno de los biosensores desarrollados para caracterizar su estabilidad.

#### VI.4.1.- Meldola's blue como mediador.

Inicialmente, se estudió la repetibilidad de sucesivas medidas amperométricas llevadas a cabo con el mismo microbiosensor, regenerando su superficie sumergiéndolo en una solución agitada  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato pH 7, KCl  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

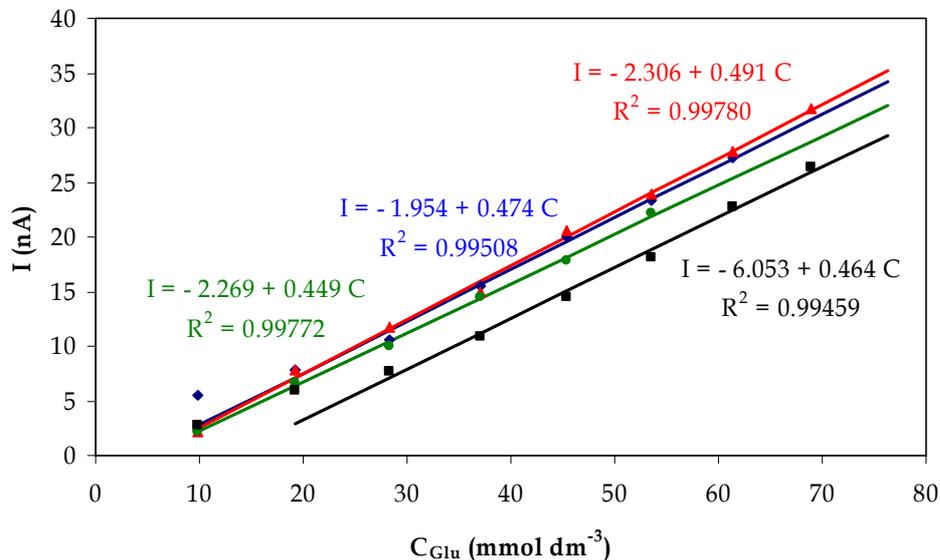
En la figura VI.4.1. se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas sobre ellos, tomando un intervalo de concentración de glucosa de  $9.804$  a  $68.966 \text{ mmol dm}^{-3}$  como variable independiente y la intensidad registrada como dependiente.

Los parámetros del calibrado, así como la desviación típica, deben ser óptimamente evaluados. La presencia de puntos anómalos y/o un rango lineal que no sea completamente válido, llevarían a estimaciones incorrectas en el cálculo de dichos parámetros, alterando la sensibilidad del biosensor.

Con este fin, se evaluaron tanto el intervalo lineal como la ausencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) [20, 27, 28].

Una de las características más notables de esta regresión es que toma como valor del "punto de ruptura muestral" el 50 %, que es el mayor valor teórico para este índice. Hampel [29] define el punto de ruptura muestral ("breakdown") como el porcentaje de datos anómalos que pueden causar que el estimador tome valores arbitrariamente alejados de los correctos. Mientras que la regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS) tiene un punto de

ruptura muestral del 0 %, la regresión LMS garantiza que al menos el 50 % de los datos siguen un modelo lineal (ajuste exacto).



**Figura VI.4.1:** Rectas de calibración obtenidas para estimar la repetibilidad del biosensor en la determinación de glucosa, utilizando MB como mediador.

Los datos anómalos pueden ser de carácter “outlier”, es decir, se encuentran alejados en el eje de ordenadas; de carácter “leverage”, alejados en el eje de abscisas; o de carácter “outlier-leverage”, alejados en ambos ejes. La regresión LMS presenta la capacidad de detectar tanto puntos “outlier” como “leverage”, considerándose “outlier” el dato cuyo residuo estandarizado es superior, en valor absoluto, a 2.5 [20].

Una vez que los puntos anómalos son detectados, se eliminan del calibrado y se construye nuevamente una regresión basada en OLS que proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico.

Estas pendientes se utilizaron para evaluar la repetibilidad del biosensor. La desviación estándar residual (RSD) asociada fue de 3.71 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

De igual manera se evaluó la reproducibilidad mediante el análisis de las pendientes de diferentes rectas de calibrado realizadas con diferentes microsensores. Tanto el intervalo de concentración de glucosa como el método utilizado para eliminar los puntos anómalos es el mismo que para el análisis de la repetibilidad.

La RSD en este caso fue de un 15 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ). Esta baja reproducibilidad, posiblemente sea debida a la dificultad de conseguir una disolución total del mediador, MB, en la solución utilizada para formar la precapa.

#### **VI.4.2.- Ferrocianuro como mediador.**

Siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de utilizar Meldola's blue como mediador, se determinó la repetibilidad y la reproducibilidad de estos biosensores. En este caso el intervalo de concentración de glucosa fue de 1.99 a 15.50 mmol dm<sup>-3</sup>.

La desviación estándar residual obtenida para la reproducibilidad en este tipo de biosensores fue de 7.09 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

En el caso de la repetibilidad, la RSD obtenida fue superior a un 15 %. Este hecho puede ser atribuido a algunas de las causas mencionadas anteriormente, como la pérdida de capacidad conductora del PPy debido a la agua oxigenada generada por la reacción enzimática [10,12].

Debido a este problema, la repetibilidad fue testada mediante la desviación estándar residual de sucesivas medidas de una sola adición de glucosa, correspondiente a  $1.99 \text{ mmol dm}^{-3}$ . La RSD asociada obtenida fue de 9.12 % ( $n = 4, \alpha = 0.05$ ).

## **VI.5. Determinación de glucosa en muestras reales.**

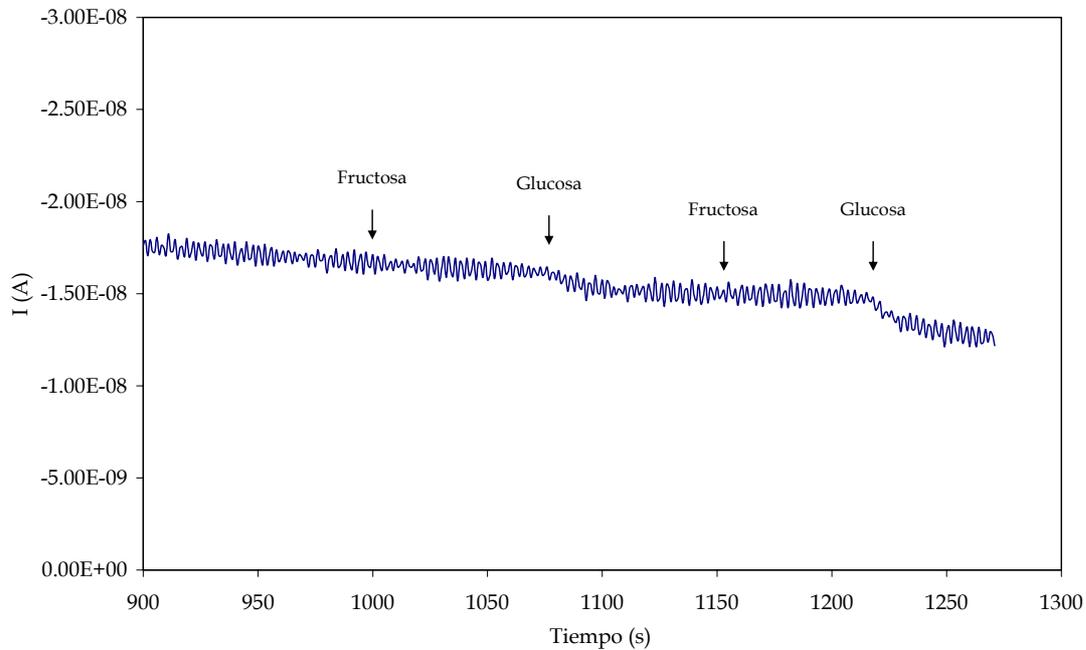
La viabilidad del biosensor basado en el empleo de ferrocianuro como mediador ha sido comprobada mediante la determinación de glucosa en muestras de mostos. Se eligió este biosensor teniendo en cuenta que en la caracterización de la estabilidad presentó mejores valores de reproducibilidad.

Como se ha mencionado anteriormente, la fructosa es uno de los posibles interferentes en la reacción enzimática que se ha seguido para la determinación de glucosa [20, 30]. Por tanto, la presencia de éste azúcar en una concentración elevada podría falsear el resultado final de concentración de glucosa calculada.

Así, se estudió inicialmente la posible interferencia de fructosa en la determinación de glucosa. Se registró un cronoamperograma donde se realizaron adiciones sucesivas de fructosa y glucosa correspondientes a  $20 \mu\text{l}$  de una solución  $0.5 \text{ mol dm}^{-3}$ .

En las condiciones optimizadas previamente para glucosa, no se observó respuesta alguna del biosensor ante las adiciones de fructosa (Fig.

VI.5.1), por lo que se pudo concluir que no va a interferir en la determinación de glucosa.

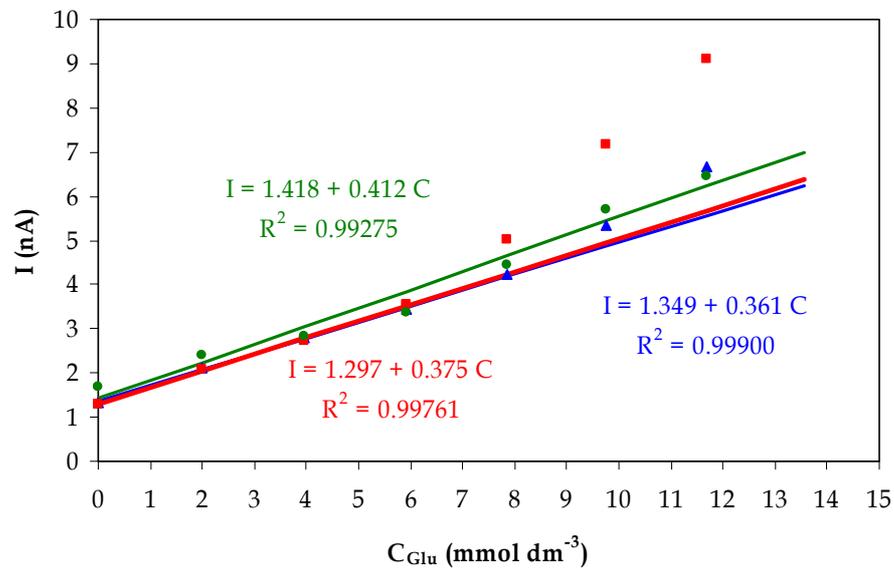


**Figura VI.5.1:** Cronoamperograma registrado utilizando un HRP-GOx biosensor, con FeCN como mediador, en las condiciones óptimas para la determinación de glucosa. Las adiciones corresponden a 20  $\mu\text{l}$  de una disolución de fructosa o glucosa, 0.5 mol  $\text{dm}^{-3}$ .

Por tanto, se utilizó el biosensor descrito para la cuantificación de glucosa en muestras de mosto facilitadas por el "Institut Català del Vi" (INCAVI).

Este análisis se realizó mediante la adición estándar de idénticos volúmenes (20  $\mu\text{l}$ ) de una solución de 0.5 mol  $\text{dm}^{-3}$  glucosa sobre una muestra de mosto.

En la figura VI.5.2. se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas sobre ellos, una vez eliminados los puntos anómalos,



**Figura VI.5.2:** Rectas de calibración obtenidas para determinar la concentración de glucosa en mosto.

La concentración de glucosa en la muestra de mosto así obtenida fue de  $319.5 \pm 37.1 \text{ gr l}^{-1}$  ( $n = 3$ ,  $\alpha = 0.05$ ), valor que se corresponde con el facilitado por el INCAVI,  $340 \text{ gr l}^{-1}$ .

## VI.- Bibliografía.

1. ISO11843-2, Capability of detection., **2000**: p. Genève, Switzerland.
2. M. Ruiz-Hernandez, *Las variedades de vid y la calidad de los vinos*, ed. E. A. Madrid Vicente. **2001**, Madrid.
3. Infoagro.com., *Métodos oficiales de análisis de vinos*. **2006**14/05/06 (05/06/06) [http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis\\_vinos.asp](http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis_vinos.asp).
4. A. Lupu, D. Compagnone, y G. Palleschi, *Screen-printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during winemaking*. Analytica Chimica Acta Papers presented at the 3rd Symposium In Vino Analytica Scientia Aveiro, Portugal, 10-12 July 2003, **2004**. 513(1): p. 67-72.
5. L. Maoy K. Yamamoto, *Glucose and choline on-line biosensors based on electropolymerized Meldola's blue*. Talanta, **2000**. 51(1): p. 187-195.
6. M. Khayyami, G. Johansson, D. Kriz, B. Xie, P.-O. Larsson, y B. Danielsson, *Flow-injection determination of trace hydrogen peroxide or glucose utilizing an amperometric biosensor based on glucose oxidase bound to a reticulated vitreous carbon electrode*. Talanta Papers presented at the Seventh International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA '95), **1996**. 43(6): p. 957-962.
7. J. Katrlik, V. Mastihuba, I. Vostiar, J. Sefcovicova, V. Stefuca, y P. Gemeiner, *Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process*. Analytica Chimica Acta, **2006**. 566(1): p. 11-18.
8. I. Paolicchi, O. Domínguez Renedo, M. Alonso Lomillo, y M. Arcos Martínez, *Application of an optimization procedure in adsorptive stripping voltammetry for the determination of trace contaminant metals in aqueous medium*. ANALYTICA CHIMICA ACTA, **2004**. 511(2): p. 223-229.
9. A. Eftekhari, *Glycerol biosensor based on glycerol dehydrogenase incorporated into polyaniline modified aluminum electrode using hexacyanoferrate as mediator*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2001**. 80(3): p. 283-289.

10. M. J. Swann, D. Bloor, T. Haruyama, y M. Aizawa, *The role of polypyrrole as charge transfer mediator and immobilization matrix for -fructose dehydrogenase in a fructose sensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, **1997**. 12(12): p. 1169-1182.
11. M. Hammerle, W. Schuhmann, y H.-L. Schmidt, *Amperometric polypyrrole enzyme electrodes: effect of permeability and enzyme location*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1992**. 6(1-3): p. 106-112.
12. D. Belanger, J. Nadreau, y G. Fortier, *Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1989**. 274(1-2): p. 143-155.
13. M. Quinto, I. Losito, F. Palmisano, y C. G. Zambonin, *Disposable interference-free glucose biosensor based on an electropolymerised poly(pyrrole) permselective film*. *Analytica Chimica Acta*, **2000**. 420(1): p. 9-17.
14. Y.-M. Uangy T.-C. Chou, *Fabrication of glucose oxidase/polypyrrole biosensor by galvanostatic method in various pH aqueous solutions*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2003**. 19(3): p. 141-147.
15. M. García Gonzalez, O. Domínguez Renedo, M. Alonso Lomillo, y M. Arcos Martinez, *Determination of gallium by adsorptive stripping voltammetry*. *TALANTA*, **2004**. 62(3): p. 457-462.
16. M. Alonso Lomillo, J. Kauffmann, y M. Arcos Martinez, *HRP-based biosensor for monitoring rifampicin*. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, **2003**. 18(9): p. 1165-1171.
17. P. Grosy M. Comtat, *A bioelectrochemical polypyrrole-containing Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> interface for the design of a NAD-dependent reagentless biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**. 20(2): p. 204-210.
18. GPES, *General Purpose Electrochemical System for Windows*, Version 4.9. **2002**, EcoChemie B.V.: Utrecht, Holanda
19. STATGRAPHICS, *STATGRAPHICS PLUS for Windows*, Version 5.1. **Copy 1994-2001**, Statistical Graphics Corp.
20. P. J. Rousseeuw y A. M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. , **1989**: p. Wiley. New York.
21. S. L. Serradilla, B.; Mora Diez, N.; Mark Jr, H.; Kauffmann, J.M., *Hydrogen peroxidase determination of a horseradish peroxidase immobilized polypyrrole*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**. 17(11-12): p. 921 - 928.

22. M. Kincl, F. Vrečer, y M. Veber, *Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug from prolonged release tablets*. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 502(1): p. 107-113.
23. M. Kincl, S. Turk, y F. Vrečer, *Application of experimental design methodology in development and optimization of drug release method*. *International Journal of Pharmaceutics*, **2005**. 291(1-2): p. 39-49.
24. A. F. Witkowski, M. S.; Brajter-Toth, A., *Effect of Electrode Substrate on the Morphology and Selectivity of Overoxidized Polypyrrole Films*. *Analytical Chemistry*, **1991**. 63: p. 622-626.
25. C. B.-T. Hsueh, A., *Electrochemical Preparation and Analytical Applications of Ultrathin Overoxidized Polypyrrole Films*. *Analytical Chemistry*, **1994**. 66: p. 2458-2464.
26. Z. Gao, M. Zi, y B. Chen, *Permeability controllable overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrodes*. *Analytica Chimica Acta*, **1994**. 286(2): p. 213-218.
27. D. L. Massart, L. Kaufman, P. J. Rousseeuw, y A. Leroy, *Least Median of Squares - a Robust Method for Outlier and Model Error-Detection in Regression and Calibration*. *Analytica Chimica Acta*, **1986**. 187: p. 171-179.
28. P. J. Rousseeuw, *Tutorial to Robust Statistics*. *Journal of Chemometrics*, **1991**. 5(1): p. 1-20.
29. F. R. Hampel, *Annals of Mathematical Statistics*, **1971**. 42: p. 1887-1896.
30. T. C. E. I. S. Brenda, *glucose oxidase (EC-Number 1.1.3.4 )*,(en línea)12/04/06 (30/05/06) Cologne University BioInformatics Center [http://brenda.bc.uni-koeln.de/php/result\\_flat.php4?ecno=1.1.3.4](http://brenda.bc.uni-koeln.de/php/result_flat.php4?ecno=1.1.3.4).

VII.- DETERMINACIÓN DE EtOH UTILIZANDO MICROCHIPS  
AMPEROMÉTRICOS.

---

---

## VII.- Objetivos.

- ✓ Estudiar la viabilidad de diferentes biosensores de primera y segunda generación basados en los enzimas Alcohol oxidasa y Horse Radish peroxidasa para la determinación de etanol, empleando microchips de platino como transductores.
- ✓ Optimizar las variables o parámetros experimentales que afectan a la variable respuesta en la determinación de etanol en muestras sintéticas, utilizando un biosensor bienzimático.
- ✓ Estudiar la reproducibilidad y repetibilidad de los biosensores construidos.
- ✓ Obtener el límite de detección para etanol mediante este método.
- ✓ Determinar cronoamperométricamente etanol en muestras reales.

## **VII.1.- Introducción.**

El vino es una bebida moderadamente alcohólica. El alcohol del vino procede del proceso natural denominado fermentación y se realiza a costa del azúcar de la uva, dando cada 17,5 gramos de azúcar un grado de alcohol, que es un uno por ciento en volumen.

El alcohol del vino es mayoritariamente etanol o alcohol etílico, encontrándose entre valores de 10° a 14°, éstos están marcados por ley en función del tipo de vino y su denominación de origen. Los vinos tintos suelen estar comprendidos entre 12° y 13° y los blancos y rosados entre 10° y 12°. Para vino tinto del año puede ser suficiente un valor de 12° de alcohol, mientras que para un vino tinto de gran reserva ha de ser de 12,5 a 13,5°. Por estas razones, el análisis del alcohol del vino es importante.

Los métodos son diversos y, desde luego, no es fácil determinar por cata el alcohol de un vino, por lo que es de gran interés la puesta a punto de métodos analíticos rápidos, precisos y económicos. Así, se discute en este capítulo la posibilidad de utilizar biosensores con esta finalidad, basados en la inmovilización en un polímero conductor [1-4].

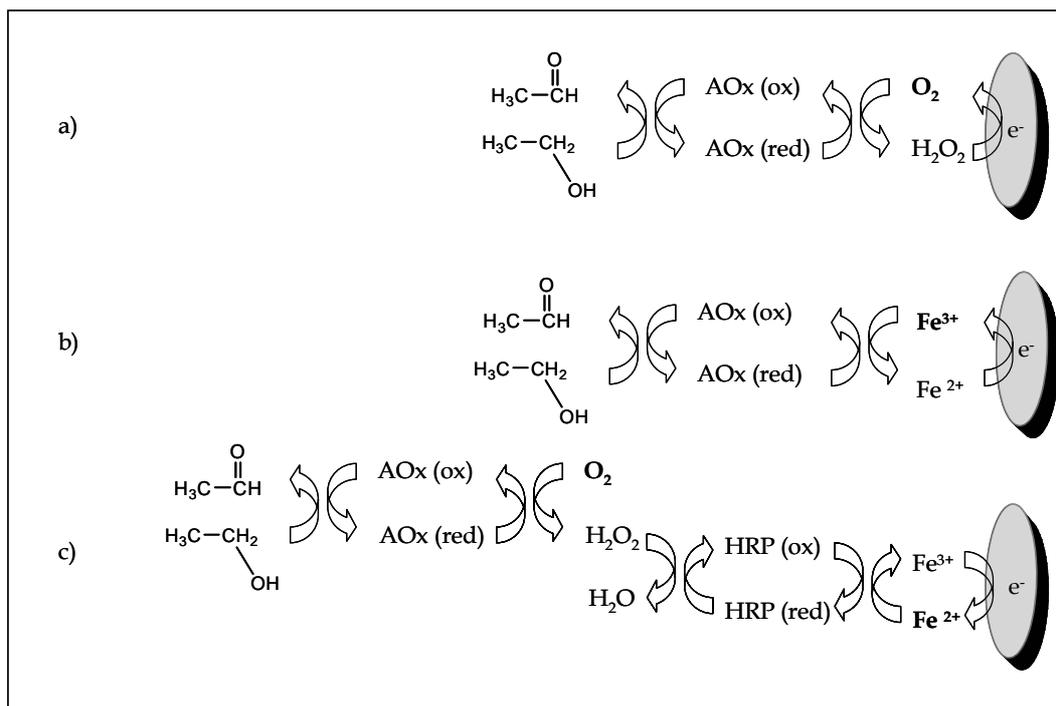
El polímero conductor empleado para la inmovilización de los enzimas fue el mismo que el utilizado en el caso descrito en el capítulo anterior, polipirrol (PPy), siguiendo el procedimiento descrito por Alonso y colab. [5].

El componente biológico utilizado para la fabricación de los biosensores fue el enzima Alcohol oxidasa (AOx), que oxida el alcohol a expensas del oxígeno presente en el medio generando agua oxigenada, cuya oxidación en el electrodo permite seguir la reacción enzimática (Fig. VII.1.1.a.). Este tipo de mecanismo define un biosensor de primera generación.

En el caso de que se utilizara un mediador en lugar del oxígeno, el biosensor sería de segunda generación (Fig. VII.1.1.b.), si bien aún no se ha encontrado un mediador adecuado para este enzima [6]. Jordan y Ciolkosz [7] postularon que AOx es una oxidasa pura, ya que el enzima sólo acepta  $O_2$  como oxidante. Esto es debido a que los dos sustratos, el alcohol y el oxígeno, se enlazan en la misma zona activa del enzima. La reacción enzimática para otras oxidasas, como por ejemplo Glucosa oxidasa, se basa en un mecanismo denominado “ping-pong” en que los dos sustratos se unen a diferentes zonas activas del enzima [7].

La combinación de los enzimas AOx y Horse Radish Peroxidasa (HRP) con un mediador, como ferrocianuro o ferricianuro, permitiría la determinación de etanol de acuerdo al mecanismo propuesto en la figura (Fig. VII.1.1.c.).

En este capítulo se describirá la fabricación de este tipo de biosensores, su caracterización y su viabilidad en la determinación de muestras reales.



**Figura VII.1.1:** (a) biosensor de primera generación, (b) biosensor de segunda generación y (c) sensor bienzimático de segunda generación.

## VII.2.- Experimental

### VII.2.1.- Reactivos, equipos y software

Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie BV, Utrecht, Holanda). Los transductores utilizados fueron fabricados en el Centro Nacional de Microelectrónica, de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo III.

Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System [8] (GPES). El análisis de datos se realizó utilizando los paquetes STATGRAPHICS PLUS [9] para el diseño de experimentos, PROGRESS [10] para la detección de puntos anómalos y la construcción de regresiones lineales y DETARCHI [11] para estimar el límite de detección.

Se utilizaron reactivos de grado analítico, sin purificación adicional. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada ultrapura (18MΩ cm).

Las disoluciones de AOx (EC. 1.1.3.13, Sigma, Steinheim, Alemania), HRP (EC. 1.11.1.7, Sigma, Steinheim, Alemania), Py (Sigma, Steinheim, Alemania), LiClO<sub>4</sub> (Panreac, Barcelona, España), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Panreac, Barcelona, España) y K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Panreac, Barcelona, España) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada uno de ellos en agua desionizada.

Como electrolito soporte se empleó una solución 0.05 mol dm<sup>-3</sup> de fosfato pH 7, 0.1 mol dm<sup>-3</sup> KCl.

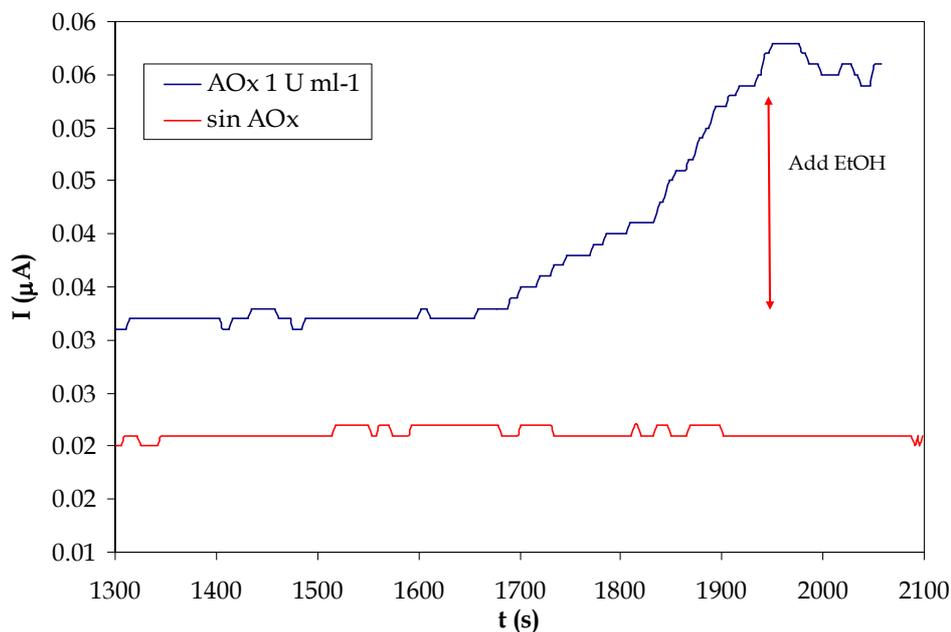
El pH de las disoluciones se cuantificó con un pHmetro Crison GLP 22 (Barcelona, España).

Las disoluciones de etanol (Panreac, Barcelona, España) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de éste en electrolito soporte.

### VII.2.2.- Experiencias previas.

Para comprobar la viabilidad de los biosensores basados en AOx se realizaron experimentos previos con el enzima y el mediador, en los casos en que fue necesario, en disolución.

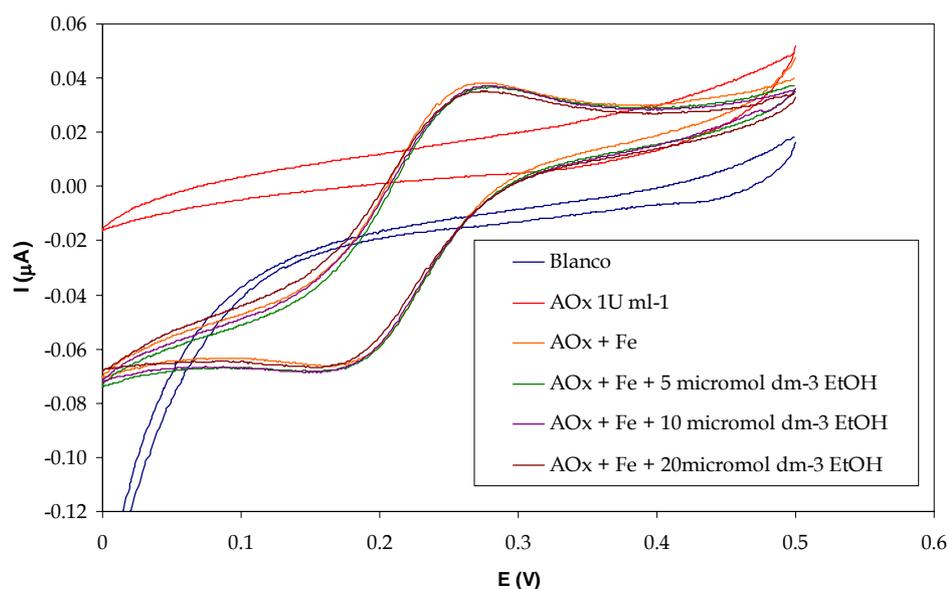
En la figura VII.2.1 pueden observarse los cronoamperogramas registrados independientemente a 0.75 V, potencial de oxidación del  $H_2O_2$ , en una disolución de electrolito de soporte con enzima disuelto o sin enzima. Evidentemente, sólo en el caso en que el enzima se encuentra en el medio de reacción se observó una respuesta significativa a la adición de EtOH ( $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  en celda).



**Figura VII.2.1:** Cronoamperogramas registrados para una adición de EtOH ( $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) con y sin AOx en el medio. Potencial aplicado, 0.75 V.

Puesto que este potencial de trabajo es bastante elevado y susceptible de encontrar interferentes en el propio medio de análisis, se analizó la posibilidad de trabajar con ferricianuro como mediador.

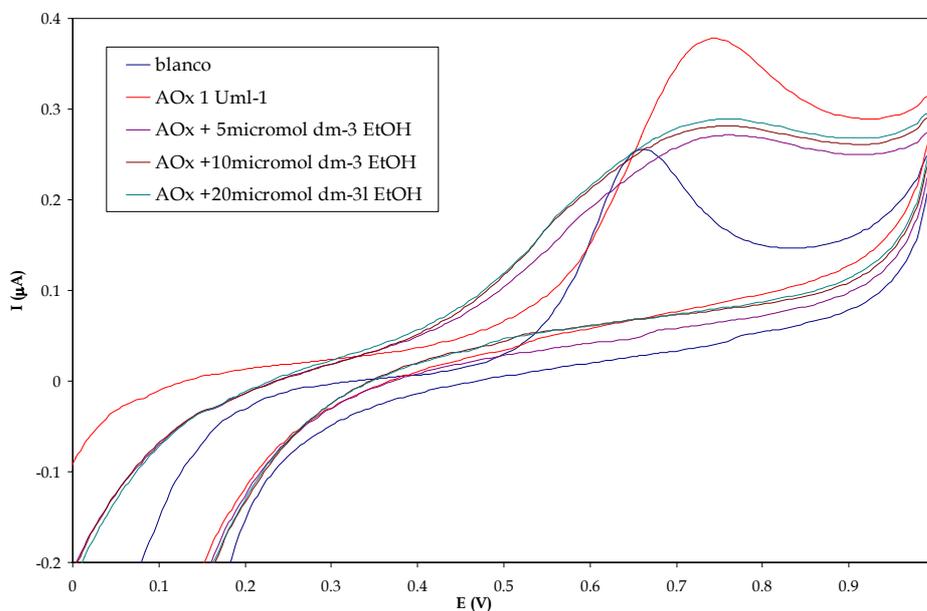
Se sumergió el microsensor amperométrico de platino, sin modificación alguna, en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de tampón fosfato pH 7,  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl y se registraron diferentes voltamperogramas cíclicos entre 0 V y 0.5 V, a una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Los barridos se realizaron en presencia de AOx  $1 \text{ UI ml}^{-1}$ , ferricianuro  $0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  y diferentes concentraciones de etanol (Fig VII.2.2).



**Figura VII.2.2:** Voltamperogramas cíclicos correspondientes a diferentes concentraciones de EtOH, en presencia de ferricianuro  $0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  y en presencia de  $1 \text{ U ml}^{-1}$  de AOx. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como se observa en la figura anterior, se registraron repetidamente voltamperogramas idénticos ante incrementos de concentración de EtOH, lo que indica que el par ferro/ferricianuro utilizado no interviene en la reacción enzimática.

Bajo condiciones similares se realizó un nuevo experimento, esta vez sin ferricianuro en solución (Fig. VII.2.3).



**Figura VII.2.3:** Voltamperogramas cíclicos correspondientes a diferentes concentraciones de EtOH, en presencia de 1 U ml<sup>-1</sup> de AOx. Velocidad de barrido, 10 mV s<sup>-1</sup>.

En este caso, los voltamperogramas registraron un ligero aumento en la intensidad de oxidación del pico registrado a 0.75 V aproximadamente, lo que confirma el efecto catalítico del enzima en la reacción y pone de manifiesto la viabilidad de la fabricación de un biosensor para la determinación de EtOH.

A lo largo del trabajo ha quedado reflejada la importancia del proceso de inmovilización enzimática en la fabricación de biosensores, condicionando el adecuado funcionamiento de los mismos [12]. Un mal atrapamiento en la membrana, puede provocar la pérdida de actividad enzimática, llegando a bloquear el acceso al centro activo e impidiendo que se produzca la reacción necesaria para la detección del analito de interés [13].

Así, de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo VI para la determinación de glucosa, se realizaron experiencias con el enzima inmovilizado en el electrodo de trabajo del chip de platino, aplicando un potencial de 0.6 V. Lamentablemente, no se obtuvieron resultados satisfactorios. Si bien potenciales más positivos conducirían a la oxidación del agua oxigenada, la matriz de PPy se vería deteriorada por la sobreoxidación, perdiendo su capacidad conductora [1, 14-17].

Teniendo en cuenta estos resultados, se recurrió a la utilización de un segundo enzima, de acuerdo al esquema mostrado en la figura VII.1.1, para la determinación de EtOH tanto en muestras sintéticas como reales.

### VII.2.3.- Modificación del electrodo de trabajo.

#### Limpieza del electrodo

Antes de la modificación de la superficie del electrodo de trabajo, es necesario realizar una limpieza del microtransductor amperométrico.

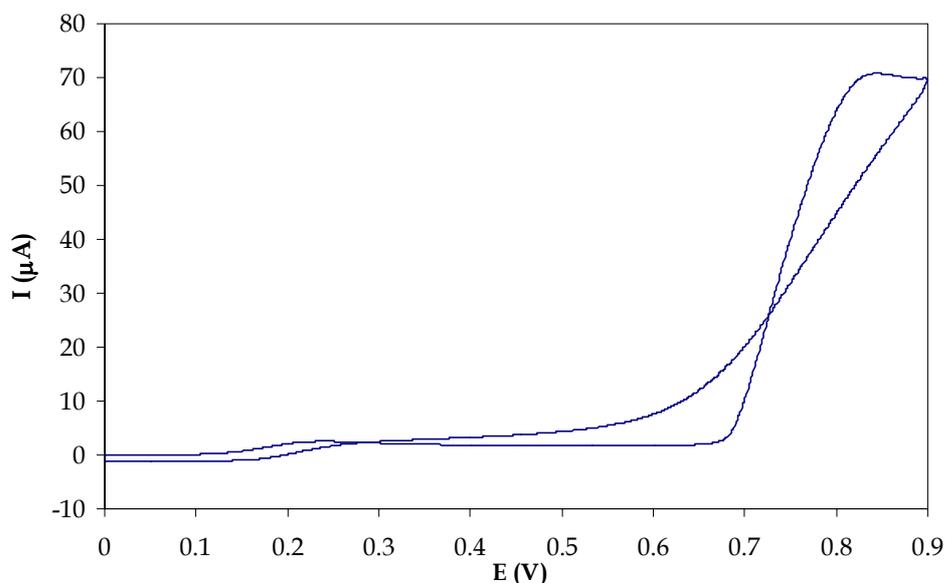
Dicha limpieza se realizó electroquímicamente, sumergiendo el sensor en una solución  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl y registrando 20 voltamperogramas cíclicos entre - 1.2 y - 2.2 V, a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Esto implica a su vez la activación de la superficie del electrodo de trabajo, lo que se comprobó mediante el registro de un voltamperograma cíclico en una disolución de ferricianuro, tal y como se ha descrito en capítulos anteriores.

Este proceso se realizó antes de cada electropolimerización, hasta obtener resultados reproducibles.

### Electropolimerización de la precapa de PPy

Para garantizar una buena inmovilización enzimática se depositó una capa de PPy sobre el electrodo de trabajo, promotora de la adhesión de las sucesivas capas del polímero que contiene los enzimas.

Con este fin, se introdujo el transductor en una solución acuosa que contenía  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de  $\text{LiClO}_4$ ,  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de pirrol y  $7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  de ferrocianuro. Se registró un voltamperograma cíclico entre 0 V y 0.9 V, a una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (Fig VII.2.4).

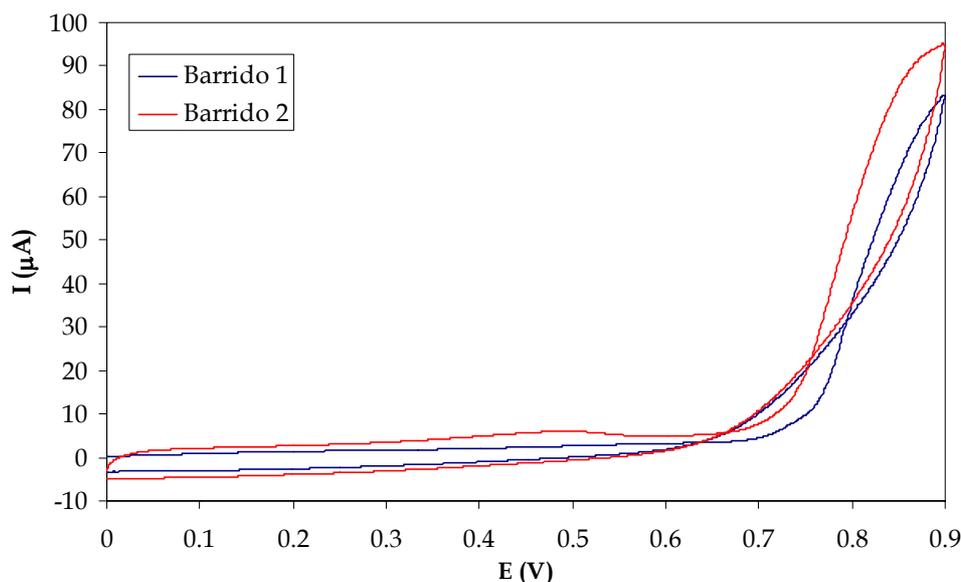


**Figura VII.2.4:** Voltamperograma cíclico correspondiente a la formación de la precapa de PPy. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Inmovilización enzimática sobre el electrodo de trabajo.

Seguidamente a la precapa, se depositó una nueva película de PPy donde se atraparon los enzimas AOX y HRP.

Esto se realizó sumergiendo el transductor en una solución acuosa en presencia de  $\text{LiClO}_4$   $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pirrol  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$ , y las concentraciones óptimas de cada una de las enzimas. Se registró un voltamperograma cíclico entre  $0 \text{ V}$  y  $0.9 \text{ V}$  (Fig. VII.2.5), durante dos ciclos completos, a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura VII.2.5:** Voltamperograma cíclico correspondiente a la inmovilización enzimática. Velocidad de barrido,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### Conservación del electrodo.

Una vez finalizado el proceso de inmovilización enzimática y en estado de no operatividad, el biosensor se conservó hasta su utilización en electrolito soporte a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## VII.3.- Optimización de las variables experimentales.

La respuesta amperométrica puede verse influenciada por el potencial aplicado ( $E_{ap}$ ), la concentración enzimática ( $C_{Enz}$ ) y la concentración de mediador, ferrocianuro ( $C_{Fe}$ ), presente en la membrana de polipirrol. La influencia de cada una de estas variables se estudió mediante la metodología del diseño de experimentos (sección VI.3).

Se realizó un diseño central compuesto  $2^3$  que consta de 17 experimentos, correspondientes a todas las posibles combinaciones entre los niveles de cada factor y de tres réplicas en el punto central, necesarias para estimar el error residual.

Los valores correspondientes a los niveles alto (+), bajo (-) y al punto central (0) para cada factor se presentan a continuación.

|                               |                                          |                                        |
|-------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|
| $E_{ap} (+) = 0.1 \text{ V}$  | $C_{Fe} (+) = 10.0 \text{ mmol dm}^{-3}$ | $C_{Enz} (+) = 4.0 \text{ mg ml}^{-1}$ |
| $E_{ap} (-) = -0.3 \text{ V}$ | $C_{Fe} (-) = 5.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  | $C_{Enz} (-) = 1.0 \text{ mg ml}^{-1}$ |
| $E_{ap} (0) = -0.1 \text{ V}$ | $C_{Fe} (0) = 7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  | $C_{Enz} (0) = 2.5 \text{ mg ml}^{-1}$ |

Estos fueron seleccionados de acuerdo a experiencias previas realizadas y reportadas en la bibliografía [5, 19, 20].

En todos los experimentos realizados durante la optimización, se mantuvo una relación de concentraciones de 1:1 entre los enzimas AOX y

HRP. La concentración de EtOH en todos los amperogramas registrados para el diseño de experimentos fue de  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Los resultados obtenidos para este diseño experimental son los que aparecen en la tabla VII.3.1. Las experiencias en las que no se obtuvo respuesta alguna, se cuantificaron con el valor de  $0.01 \text{ nA}$  para poder realizar el análisis de los resultados, que se presenta en forma de ANOVA (tabla VII.3.2).

**Tabla VII.3.1.:** Resultados del diseño central compuesto  $2^3$  para la optimización de los parámetros experimentales en la determinación de EtOH ( $C_{\text{EtOH}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ).

| $E_{\text{ap}}$ (V) | $C_{\text{Fe}}$ ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ) | $C_{\text{Enz}}$ ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ) | I (nA) |
|---------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------|
| -0.30               | 1.00                                      | 5.00                                       | 19.00  |
| 0.10                | 1.00                                      | 5.00                                       | 0.00   |
| -0.30               | 4.00                                      | 5.00                                       | 18.00  |
| 0.10                | 4.00                                      | 5.00                                       | 0.01   |
| -0.30               | 1.00                                      | 10.00                                      | 22.00  |
| 0.10                | 1.00                                      | 10.00                                      | 0.01   |
| -0.30               | 4.00                                      | 10.00                                      | 5.80   |
| 0.10                | 4.00                                      | 10.00                                      | 0.01   |
| -0.44               | 2.50                                      | 7.50                                       | 45.00  |
| 0.24                | 2.50                                      | 7.50                                       | 0.01   |
| -0.10               | 0.02                                      | 7.50                                       | 5.00   |
| -0.10               | 5.02                                      | 7.50                                       | 2.50   |
| -0.10               | 2.50                                      | 3.30                                       | 3.50   |
| -0.10               | 2.50                                      | 11.70                                      | 3.00   |
| -0.10               | 2.50                                      | 7.50                                       | 4.00   |
| -0.10               | 2.50                                      | 7.50                                       | 3.70   |
| -0.10               | 2.50                                      | 7.50                                       | 1.20   |

**Tabla VII.3.2:** ANOVA de los datos obtenidos mediante la metodología de diseño de experimentos.

S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados;  $F_{exp} = MC_{factor}/MC_{error}$ ;  $P_{actual}$ , nivel de probabilidad;

\* Factores significativos a  $\alpha = 0.05$ .

| Efecto              | S.C.    | G.L. | M.C.    | $F_{exp}$ | Pactual         |
|---------------------|---------|------|---------|-----------|-----------------|
| A : E <sub>ap</sub> | 1444.93 | 1    | 1444.93 | 611.40    | <b>0.0016 *</b> |
| B: C <sub>Enz</sub> | 33.55   | 1    | 33.55   | 14.19     | 0.0638          |
| C: C <sub>Fe</sub>  | 7.38    | 1    | 7.38    | 3.12      | 0.2192          |
| AA                  | 465.96  | 1    | 465.96  | 197.16    | <b>0.0050*</b>  |
| AB                  | 36.98   | 1    | 36.98   | 15.65     | 0.0584          |
| AC                  | 10.58   | 1    | 10.58   | 4.48      | 0.1686          |
| BB                  | 0.45    | 1    | 0.45    | 0.19      | 0.7045          |
| BC                  | 28.88   | 1    | 28.88   | 12.22     | 0.0730          |
| CC                  | 1.60    | 1    | 1.60    | 0.68      | 0.4968          |
| Fallo de ajuste     | 145.83  | 5    | 29.17   | 12.34     | 0.0767          |
| Error puro          | 4.73    | 2    | 2.36    |           |                 |
| Total (corr)        | 2275.35 | 16   |         |           |                 |

$$R^2 = 0.93383$$

Tanto el efecto correspondiente al potencial aplicado como el de su interacción cuadrática influyen significativamente en el valor de la respuesta (Fig VII.3.2), siendo el modelo adecuado ya que no se observó fallo de ajuste ( $P_{actual} > 0.05$ ) a un nivel de confianza del 95 %.

Por tanto, los valores de concentración de mediador y de enzimas se fijaron en los correspondientes al punto central, 7.5 mmol dm<sup>-3</sup> y 2.5 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente.

En la siguiente figura se muestran dos superficies de respuesta obtenidas manteniendo constante la C<sub>Enz</sub> (Fig VII.3.3 a) y C<sub>Fe</sub> (Fig VII.3.3 b).

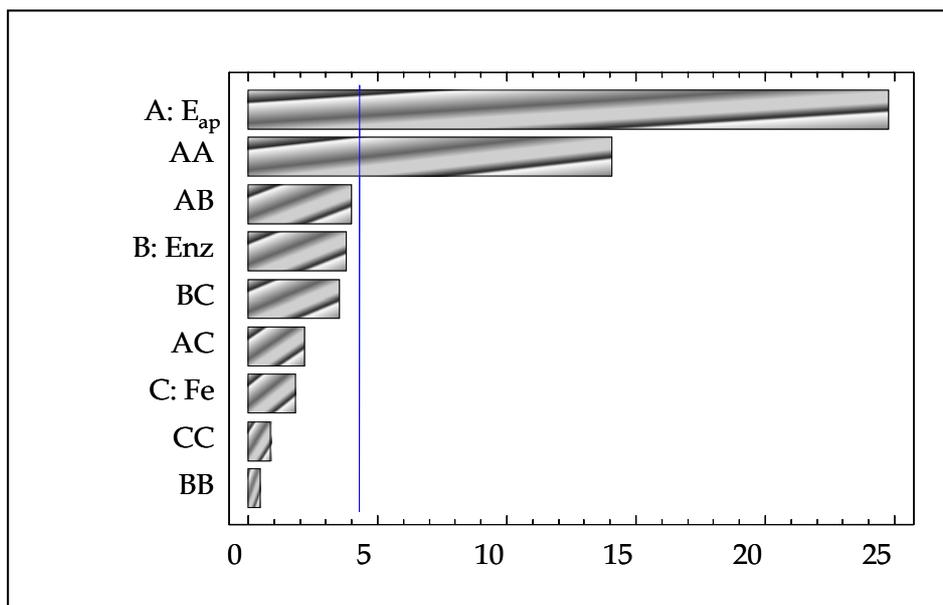


Figura VII.3.2: Diagrama de Pareto para la variable respuesta.

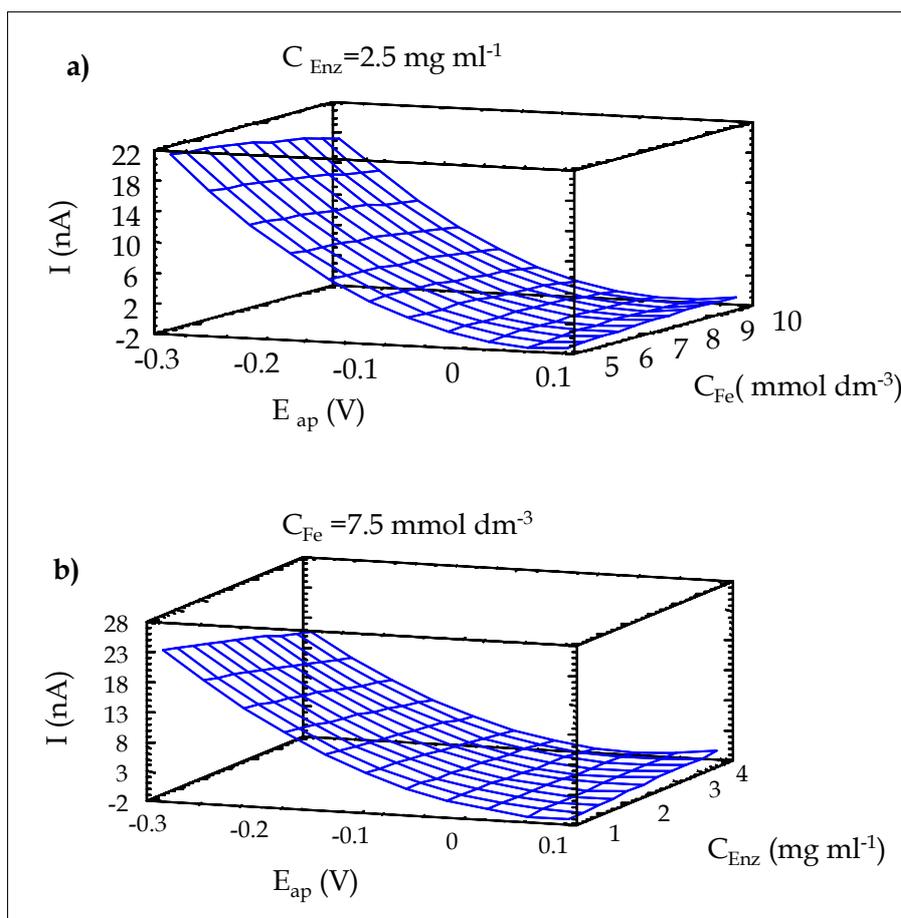
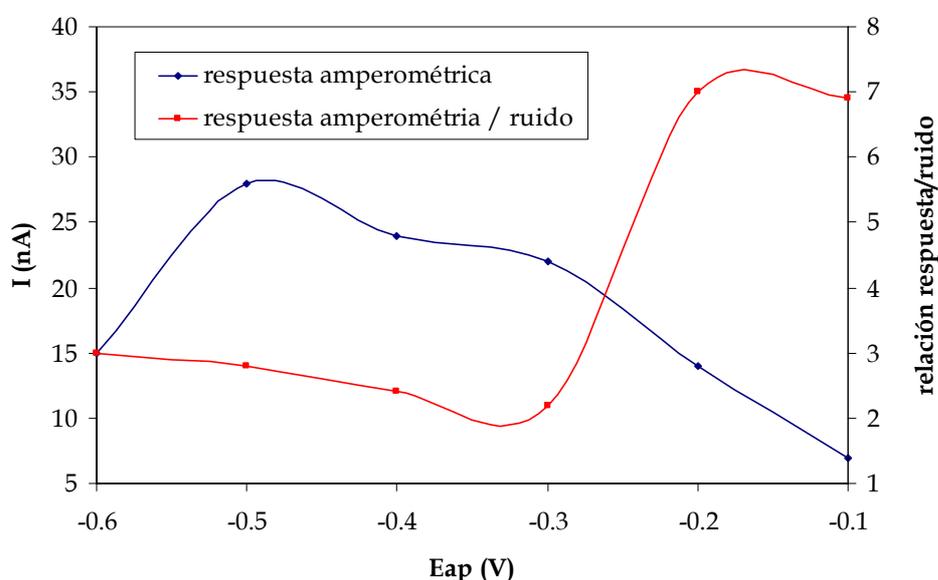


Figura VII.3.3: Superficies de respuesta obtenidas para el valor correspondiente al punto central de (a)  $C_{Enz}$  y (b)  $C_{Fe}$ .

Como se puede ver en ambos casos, el valor de la señal aumenta a medida que el potencial aplicado va disminuyendo. Por tanto se consideró adecuado realizar una nueva optimización de éste llegando hasta potenciales más negativos.

Se registraron diversos cronoamperogramas a potenciales comprendidos entre - 0.1 V y - 0.6 V. La concentración de EtOH en todos los experimentos fue la misma que la utilizada para el diseño de experimentos, 10 mmol dm<sup>-3</sup>, y la de enzimas y de mediador, los valores óptimos obtenidos.

A medida que disminuía el potencial de trabajo, se observó un incremento del ruido de fondo, por lo que se consideró oportuno tener en cuenta este parámetro al seleccionar el potencial. En la figura VII.3.4 se muestra el valor de intensidad recogido y la relación entre este y el ruido de fondo.



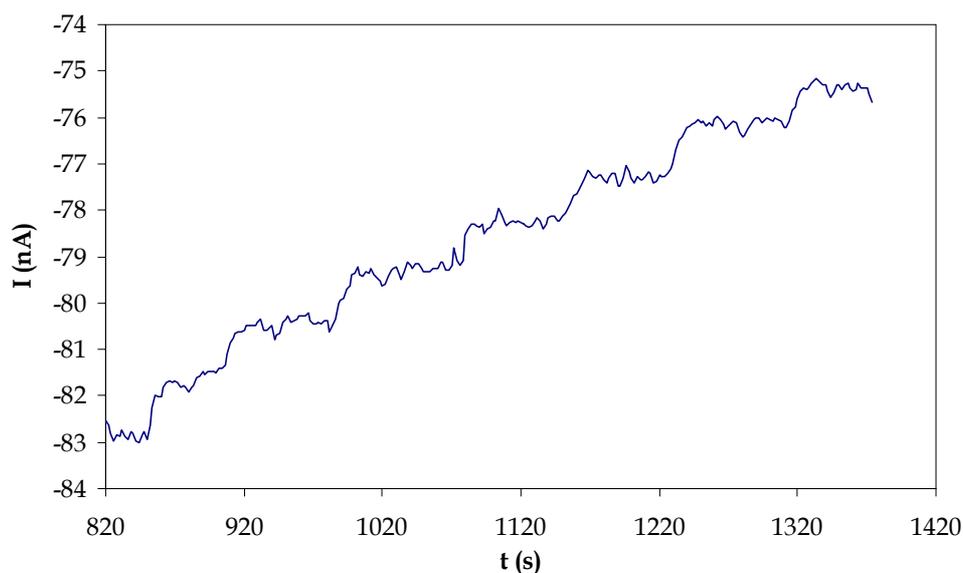
**Figura VII.3.4:** Respuesta amperométrica en función del potencial aplicado y relación de esta respuesta con el ruido de fondo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó como potencial de trabajo -0.2 V, que aunque no sea el valor que registra mayor intensidad, es el valor máximo de la relación de los valores de la relación respuesta-ruido.

Así, se seleccionaron los siguientes valores óptimos de las variables experimentales para la determinación de EtOH,

$$E_{ap} = -0.2 \text{ V} \quad C_{Enz} = 2.5 \text{ mg ml}^{-1} \quad C_{Fe} = 7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$$

En la figura VII.3.5 se muestra un cronoamperograma registrado en estas condiciones experimentales.



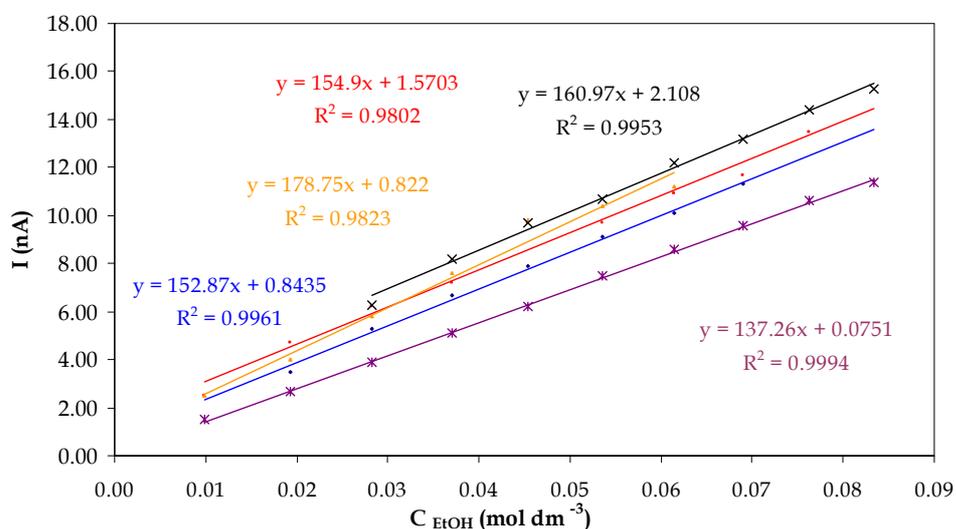
**Figura VII.3.5:** Cronoamperogramas registrados para la determinación de EtOH con un sensor bienzimático y un sensor modificado con PPy. Cada adición corresponde a 200  $\mu\text{l}$  de una solución 0.5  $\text{mol dm}^{-3}$  de EtOH.

## VII.4.- Estabilidad del biosensor.

La repetibilidad y reproducibilidad de estos dispositivos se analizó a través de la desviación estándar residual (RSD) de las pendientes asociadas a las distintas curvas de calibración realizadas.

Inicialmente, se realizó un estudio de la repetibilidad de diferentes medidas cronoamperométricas realizadas con un mismo electrodo modificado con las condiciones óptimas descritas anteriormente.

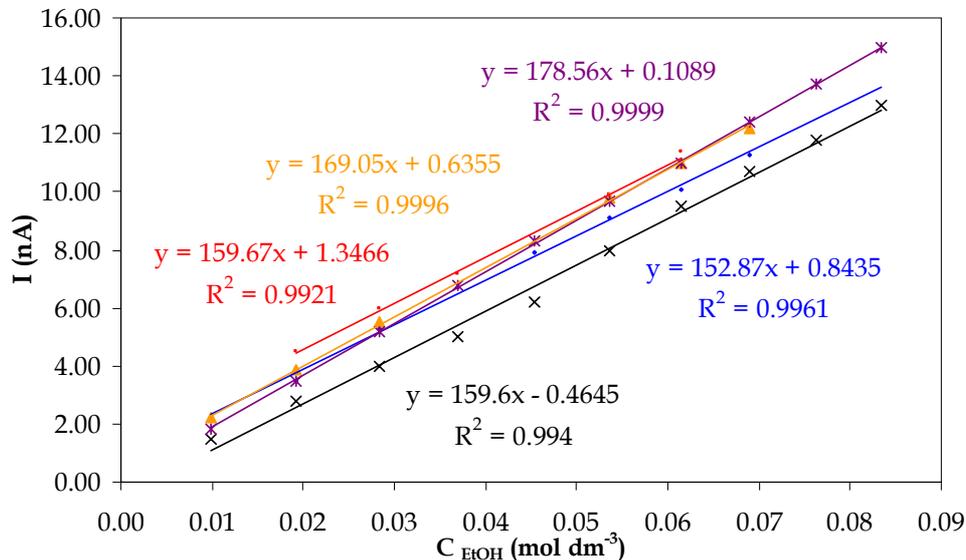
En la figura VII.4.1 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas, tomando un intervalo de concentración de EtOH de 9.8 mmol dm<sup>-3</sup> a 83 mmol dm<sup>-3</sup>.



**Figura VII.4.1:** Puntos experimentales y rectas de calibración obtenidas para estimar la repetibilidad del biosensor para la determinación de EtOH.

Los puntos anómalos fueron eliminados una vez detectados mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) [10] (sección VI.4.1). La desviación estandar residual (RSD) asociada a las pendientes de dichas rectas fue de 9.03% (n=5).

De igual manera, se comprobó la reproducibilidad del biosensor. Con este fin, se analizaron las pendientes de cinco rectas de calibración construidas en el mismo intervalo de concentración que el utilizado para comprobar la repetibilidad, utilizando biosensores distintos para cada una. Los puntos anómalos fueron también eliminados mediante una regresión LMS (Fig.VII.4.2). La RSD asociada a las pendientes de dichas rectas fue de 6.09% (n=5), valor que junto con el de repetibilidad pone de manifiesto la fiabilidad de los biosensores diseñados para la determinación de etanol.



**Figura VII.4.2:** Puntos experimentales y rectas de calibración obtenidas para estimar la reproducibilidad del biosensor para la determinación de EtOH.

## **VII.5.- Límite de detección.**

Para caracterizar un procedimiento analítico es importante establecer su límite de detección [11], lo que conlleva relacionar la señal medida con la concentración de analito mediante la realización de un calibrado previo, que garantice las hipótesis del método mínimo-cuadrático.

Se realizaron tres calibrados de EtOH, en las condiciones experimentales optimizadas en etapas anteriores, en un intervalo de concentración de  $9.8 \text{ mmol dm}^{-3}$  a  $83 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

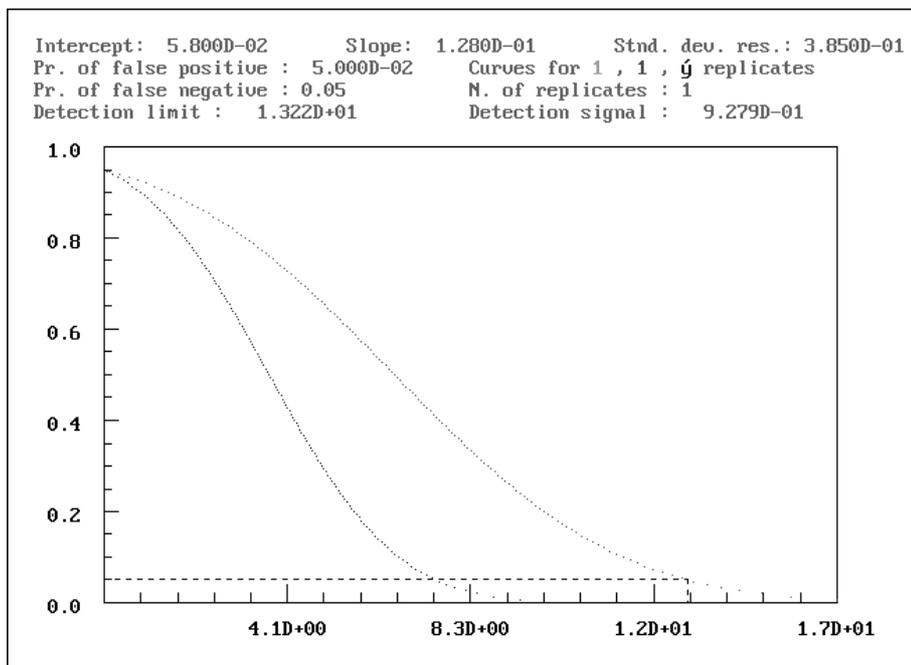
Los parámetros de estos calibrados, así como la desviación típica, fueron óptimamente evaluados de acuerdo al procedimiento descrito en secciones anteriores, mediante una regresión LMS.

De acuerdo con la norma ISO 11843-2 [21], la capacidad de detección de un procedimiento analítico debe ser interpretada asumiendo tanto la probabilidad de falso positivo ( $\alpha$ ) como la de falso negativo ( $\beta$ ). Con este fin, se aplicó el método desarrollado por Clayton y colab. [22], que plantean el problema como un test de hipótesis, teniendo en cuenta la relación entre la señal y la concentración.

Una representación de los valores de  $\beta$  frente a la correspondiente concentración constituye una descripción detallada del procedimiento analítico en términos de su "capacidad de detección".

En este trabajo se han construido dichas curvas de detección utilizando el programa de cómputo DETARCHI [11], utilizando las regresiones OLS, sin puntos anómalos, obtenidas previamente (Fig VII.5.1). De esta manera, se obtiene el límite de detección del procedimiento analítico, una vez fijada la

probabilidad de falso positivo, sin más que elegir la probabilidad de falso negativo y el número de réplicas deseadas.



**Figura VII.5.1:** *Curva característica de detección. Señal de detección, nA y límite de detección, nmol dm<sup>-3</sup>.*

El LOD medio obtenido, para  $\alpha = \beta = 0.05$  y una réplica, fue de  $2.9 \pm 0.4$  mmol dm<sup>-3</sup>.

## **VII.6. Determinación de etanol en muestras reales.**

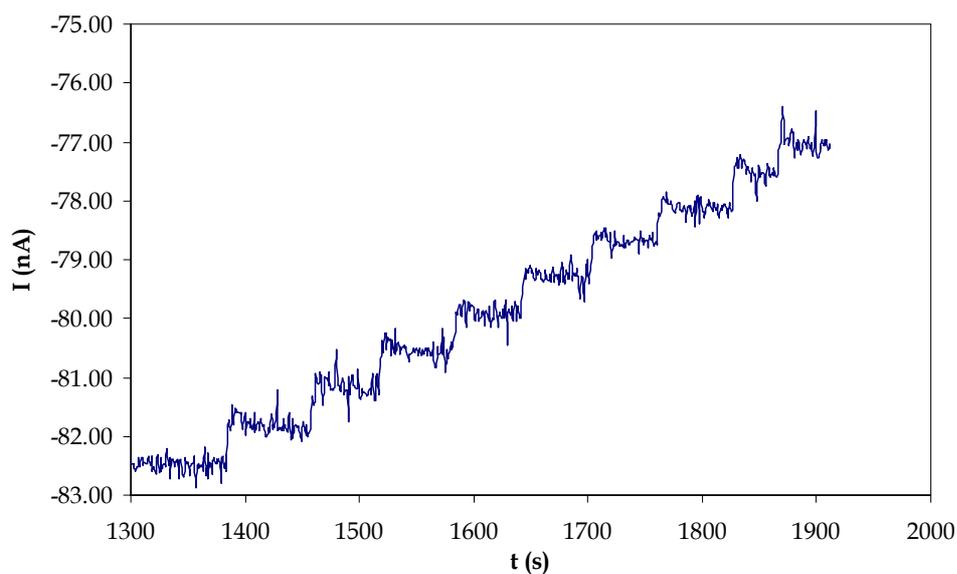
Puesto que el objetivo final del presente trabajo es demostrar la posible aplicación de estos biosensores dentro de la industria alimentaria, se procedió a la determinación de etanol en diferentes muestras de vino blanco facilitadas por el “institut català del vi” (INCAVI).

La metodología utilizada en el INCAVI para la determinación del grado alcohólico volumétrico adquirido (GAV) consiste en la destilación de la muestra, y una vez separado el etanol de las sustancias interferentes, se estima la cantidad de éste a través de medidas de densidad [23]. En la tabla VII.6.1 se muestran los valores de contenido en etanol en las muestras analizadas, de acuerdo a este procedimiento.

En el caso del biosensor propuesto para la cuantificación de etanol, la metodología consistió en adiciones estándar utilizando técnicas de regresión univariante.

Se registraron diversos cronoamperogramas, en las condiciones optimizadas, mediante adiciones de 200  $\mu\text{l}$  de una solución 0.5 mol  $\text{dm}^{-3}$  de etanol sobre una muestra de vino sin tratamientos previos (Fig VII.6.1). Las rectas de regresión realizadas sobre la intensidad cuantificada para cada concentración de etanol frente a dicha concentración, conduce a los valores de concentración de etanol en vino.

Los resultados obtenidos con estos biosensores así como los datos facilitados por el INCAVI se muestran en la tabla VII.6.1. Como se puede ver, grado alcohólico volumétrico adquirido calculado se corresponde con los datos calculados con el método estándar.



**Figura VII.6.1:** Cronoamperograma obtenido para una de las adiciones estándar realizadas. Potencial aplicado,  $-0.2V$ .

**Tabla VII.6.1:** Concentración de etanol en distintas muestras de vino calculada con los biosensores desarrollados ( $n = 3$ ,  $\alpha = 0.05$ ), y valores estimados por el INCAVI.

|                  | Muestra 1791    | Muestra 1850    | Muestra 1877   |
|------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 1ª medida        | 12.62           | 14.8            | 9.22           |
| 2ª medida        | 14.92           | 13.01           | 9.06           |
| 3ª medida        | 10.14           | 9.87            | 11.3           |
| media            | $12.57 \pm 2.7$ | $12.72 \pm 2.4$ | $9.86 \pm 1.9$ |
| Resultado INCAVI | 11.55           | 11.65           | 11.2           |

## VII.- Bibliografía.

1. D. Belanger, J. Nadreau, y G. Fortier, *Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **1989**. 274(1-2): p. 143-155.
2. M. Quinto, I. Losito, F. Palmisano, y C. G. Zambonin, *Disposable interference-free glucose biosensor based on an electropolymerised poly(pyrrole) permselective film*. Analytica Chimica Acta, **2000**. 420(1): p. 9-17.
3. Y.-M. Uangy T.-C. Chou, *Fabrication of glucose oxidase/polypyrrole biosensor by galvanostatic method in various pH aqueous solutions*. Biosensors and Bioelectronics, **2003**. 19(3): p. 141-147.
4. C. A. B. Garcia, G. D. Neto, L. T. Kubota, y L. A. Grandin, *A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **1996**. 418(1-2): p. 147-151.
5. M. A. Alonso Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, y F. J. Muñoz Pascual, *Biosensor based on platinum chips for glucose determination*. Analytica Chimica Acta, **2005**. 547(2): p. 209-214.
6. A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, y L. P. Fonseca, *Ethanol biosensors based on alcohol oxidase*. Biosensors & Bioelectronics, **2005**. 21(2): p. 235-247.
7. J. Jordan, *Enzymatic mechanisms oand electron-trensfer mediation in chronoamperometric biosensors*. Journal of solution chemistry, **1991**. 20(10): p. 995-1000.
8. GPES, *General Purpose Electrochemical System for Windows*, Version 4.9. **2002**, EcoChemie B.V.: Ultrech, Holanda
9. STATGRAPHICS, *STATGRAPHICS PLUS for Windows*, Version 5.1. **Copy 1994-2001**, Statistical Graphics Corp.

10. P. J. Rousseeuw y A. M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*. **2003**, New Jersey: Wiley and Sons. Inc.
11. L. Sarabiay M. C. Ortiz, *Detarchi - A Program For Detection Limits With Specified Assurance Probabilities And Characteristic Curves Of Detection*. *Trac-Trends In Analytical Chemistry*, **1994**. 13(1): p. 1-6.
12. D. G. Buerk, *Biosensors, Theory and Applications*. **1993**, Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc.
13. B. Eggins, *Biosensors, an introduction*. **1996**: John Wiley & Sons Ltd.
14. Z. Q. Gao, M. X. Zi, y B. S. Chen, *Permeability Controllable Overoxidised Polypyrrole Film-Modified Glassy-Carbon Electrodes*. *Analytica Chimica Acta*, **1994**. 286(2): p. 213-218.
15. C. C. Hsuehy A. Brajtertoth, *Electrochemical Preparation and Analytical Applications of Ultrathin Overoxidized Polypyrrole Films*. *Analytical Chemistry*, **1994**. 66(15): p. 2458-2464.
16. A. Witkowski, M. S. Freund, y A. Brajtertoth, *Effect of Electrode Substrate on the Morphology and Selectivity of Overoxidized Polypyrrole Films*. *Analytical Chemistry*, **1991**. 63(6): p. 622-626.
17. M. J. Swann, D. Bloor, T. Haruyama, y M. Aizawa, *The role of polypyrrole as charge transfer mediator and immobilization matrix for -fructose dehydrogenase in a fructose sensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, **1997**. 12(12): p. 1169-1182.
18. S. Yang, Y. Lu, P. Atanossov, E. Wilkins, y X. Long, *Microfabricated glucose biosensor with glucose oxidase entrapped in sol-gel matrix*. *Talanta*, **1998**. 47(3): p. 735-743.
19. N. Pena, *Reticulated vitreous carbon-based composite bienzyme electrodes for the determination of alcohols in beer samples*. *Analytical letters*, **2002**. 35(12): p. 1931-1944.
20. A. Guzman-Vazquez de Prada, N. Pena, C. Parrado, A. J. Reviejo, y J. M. Pingarron, *Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes*. *Talanta*, **2004**. 62(5): p. 896-903.
21. ISO11843-2, *Capability of detection.*, **2000**: p. Genève, Switzerland.
22. C. A. Clayton, J. W. Hines, y P. D. Elkins, *Detection Limits with Specified Assurance Probabilities*. *Analytical Chemistry*, **1987**. 59(20): p. 2506-2514.
23. M. A. O. Amerine, C.S., *Analisis de vinos y mostos*, ed. E. Acribia. **1976**, Zaragoza.

VIII.- DETERMINACIÓN DE GLUCOSA UTILIZANDO TRANSDUCTORES  
SERIGRÁFICOS.

---

---

## **VIII.- Objetivos.**

- ✓ Estudiar la viabilidad de un biosensor basado en los enzimas Horse Radish peroxidasa (HRP) y Glucosa oxidasa (GOx), inmovilizados con serum de albúmina bovina (BSA) y gluteraldehído, para la determinación de glucosa, empleando chips fabricados con métodos serigráficos.
  
- ✓ Optimizar las variables o parámetros experimentales que afectan a la variable respuesta, mediante la metodología del diseño de experimentos.
  
- ✓ Estudiar la reproducibilidad y repetibilidad de los biosensores construidos.
  
- ✓ Establecer el límite de detección del procedimiento.
  
- ✓ Determinar cronoamperométricamente glucosa en muestras reales de distintos mostos.

## **VIII.1.- Introducción.**

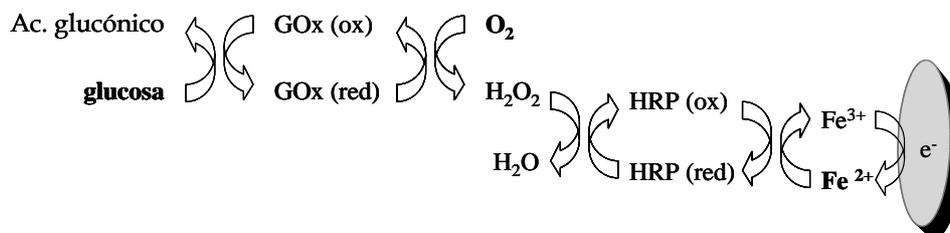
Como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior, la serigrafía es una de las tecnologías mejor establecidas para la fabricación de transductores electroquímicos, debido a su bajo coste y la posibilidad de producción masiva de éstos [1].

Combinando estas ventajas con las asociadas a los biosensores enzimáticos, es factible la obtención de dispositivos de respuesta rápida, bajo coste y, por tanto, desechables [2,3]. Estas características hacen de los biosensores serigráficos una herramienta analítica de gran interés para control de calidad en la industria alimentaria [4].

En este capítulo se detalla la fabricación y caracterización de un biosensor para la determinación de glucosa en mosto empleando los transductores fabricados mediante técnicas serigráficas descritos en el capítulo IV.

Se ha diseñado un sensor bienzimático basado en GOx y HRP, con el fin de determinar la glucosa presente en diferentes muestras de mosto. El

seguimiento de la reacción enzimática se llevó a cabo mediante la reducción de un mediador, ferrocianuro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que reduce el potencial de la oxidación electroquímica del peróxido de hidrógeno [5], de acuerdo con el esquema presentado en la figura VIII.1.1.



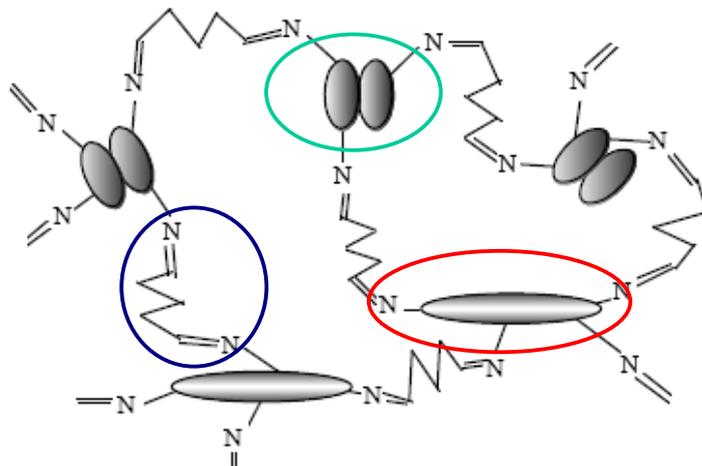
**Figura VIII.1.1:** Mecanismo de detección del sensor bienzimático.

El proceso más delicado en la fabricación de un biosensor; para su perfecto funcionamiento, coste de producción y tiempo empleado en ésta, es la inmovilización enzimática. El método seleccionado para este fin fue el entrecruzamiento o "cross-linking" de los enzimas GOx y HRP, ya que permite una fabricación rápida y barata sin grandes pérdidas en la actividad enzimática [6].

Uno de los entrecruzadores más utilizados para la inmovilización de proteínas sobre electrodos es el glutaraldehído [7-11], que forma un enlace de gran estabilidad con los grupos amino de las proteínas [12]. Fue el utilizado también en el desarrollo de este trabajo.

El enzima HRP es de pequeñas dimensiones, y tiene una alta solubilidad en agua [13], por lo que se utilizó una proteína inerte como el serum de albúmina bovina (BSA), que modifica el material biológico reduciendo la solubilidad y aumentando el tamaño [14], facilitando así su inmovilización en glutaraldehído. La estructura que forma este entrecruzador con las enzimas es aún desconocida [7,15], pero debido a la formación de

enlaces tan estables con los mismos se cree que es posible la formación de ciclos similares a los mostrados en la figura VII.1.2 [12].



**Figura VIII.1.2:** Posible estructura del entrecruzamiento de los enzimas (línea verde) con BSA (línea roja) y glutaraldehído (línea azul).

## VIII.2.- Experimental

### VIII.2.1.- Reactivos, equipos y software.

La inmovilización enzimática se llevó a cabo sobre los transductores amperométricos fabricados mediante técnicas serigráficas descritos en el capítulo IV de este trabajo.

Se utilizaron reactivos de grado analítico sin purificación adicional. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (18M $\Omega$  cm).

Las disoluciones de GOx (EC.1.1.3.4, Sigma, Steinheim, Alemania), HRP (EC 1.11.1.7, Sigma, Steinheim, Alemania) y BSA (Aldrich, Steinheim, Alemania), se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada uno de ellos en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de tampón fosfato a  $\text{pH} = 7$ ,  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl (Panreac, Barcelona, España) (electrolito soporte). Como entrecruzador, se utilizó gluteraldehído (Flucka, Steinheim, Alemania).

Las disoluciones de glucosa se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de ésta en la solución de electrolito soporte.

El pH de las disoluciones se cuantificó con un pHmetro Crison GLP 22 (Barcelona, España).

Todas las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie BV, Utrecht, Holanda).

Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el software General Purpose Electrochemical System [16] (GPES). El análisis de datos se realizó utilizando los programas informáticos STATGRAPHICS PLUS [17], para los diseños de experimentos, PROGRESS [18], para las regresiones lineales, y DETARCHI [19], para determinar el límite de detección.

## VIII.2.2- Modificación del electrodo de trabajo.

### Inmovilización enzimática

En este caso, la inmovilización de los enzimas (GOx y HRP) se realizó mediante entrecruzamiento con BSA y gluteraldehído, para lo que se

disolvieron los enzimas y el BSA en  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  tampón fosfato pH 7,  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  (Concentración de cada uno de ellos, 1.66% [13]). Esta solución se mezcló a su vez, en una relación 1:1, con gluteraldehído (GA) (2.5% solución acuosa).

Cabe destacar que previamente a la inmovilización enzimática fue necesario realizar una activación de la superficie del transductor, tal y como se describe en la sección IV.4.2.

Se depositaron sobre el electrodo de trabajo  $5 \mu\text{l}$  de esta muestra, y se dejaron reaccionar durante una hora a  $4^\circ\text{C}$ . Finalmente, el exceso de gluteraldehído fue eliminado con agua.

A diferencia de otros biosensores descritos en esta memoria, en este caso se trabaja con el mediador, ferrocianuro, en solución, debido a la dificultad para mantener este mediador inmovilizado en la membrana enzimática de forma estable.

#### **Conservación del electrodo.**

Previo a su utilización, es necesario acondicionar el sensor durante una hora en una solución de electrolito soporte.

Cuando los biosensores no están operativos, se almacenaron en una solución de electrolito soporte a  $4^\circ\text{C}$ .

## **VIII.3.- Caracterización del biosensor**

### **VIII.3.1 Experiencias previas**

Un paso previo a la optimización de las variables experimentales que determinarán las condiciones de las mismas para obtener la mejor respuesta de estos biosensores, es la comprobación de que existe respuesta amperométrica a las adiciones de glucosa debida a la reacción enzimática y no a la oxidación o reducción directa del analito en el electrodo.

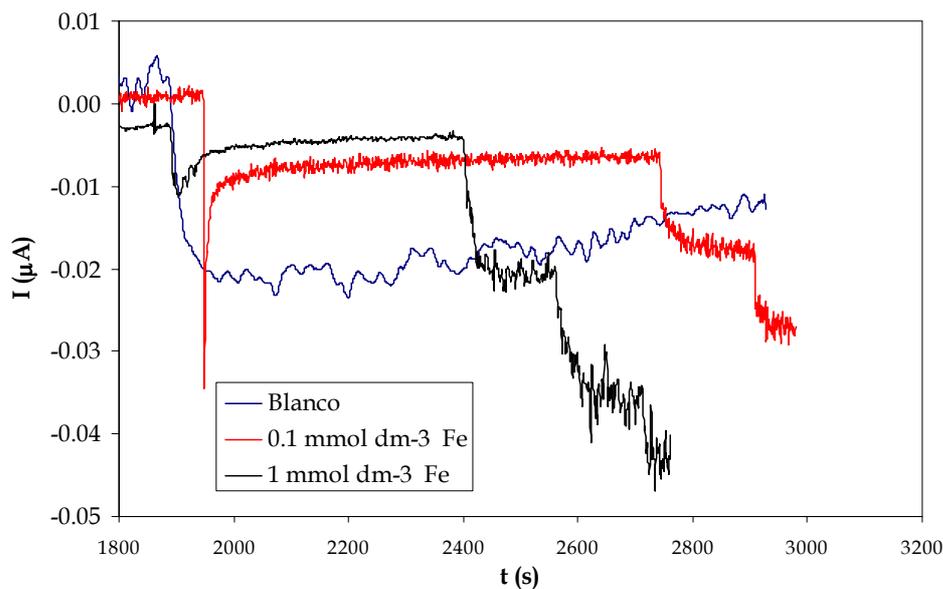
Con este fin se utilizaron dos transductores, uno de ellos enzimáticamente modificado y otro como blanco,

- SPE + GO<sub>x</sub>-HRP-BSA-GA
- SPE + BSA-GA

Estas pruebas se realizaron con dos concentraciones de ferrocianuro en celda diferentes, 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> y 1 mmol dm<sup>-3</sup>.

Según la bibliografía existente [8, 20] y la experiencia adquirida en el grupo de trabajo con sensores bienzimáticos basados en HRP y ferrocianuro, este tipo de dispositivos trabajan a un potencial aplicado en torno a - 0.1 V, por lo que fue el potencial seleccionado en esta etapa de la experimentación.

En la figura VIII.3.1 se muestran los amperogramas obtenidos en los experimentos descritos, para diferentes adiciones de 20 µl de una solución de 5 mmol dm<sup>-3</sup>glucosa.



**Figura VIII.3.1:** Respuesta cronoamperométrica para diferentes adiciones de  $20 \mu\text{l}$  de  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  de glucosa utilizando tres dispositivos diferentes. Potencial aplicado,  $-0.1 \text{ V}$ .

El primer aumento de intensidad que se registra en los tres cronoamperogramas, corresponde a la adición del mediador en la celda de medida. Seguidamente y una vez alcanzada una línea base estable, se adicionó glucosa, pero sólo se obtuvo respuesta en los casos en que el electrodo había sido modificado enzimáticamente (líneas roja y verde).

A concentraciones más elevadas de mediador se observó mayor respuesta, pero también se obtuvo una señal con más ruido de fondo. Por esta razón se decidió partir de la concentración de mediador menor para la optimización de las variables.

### VIII.3.2 Optimización de las variables experimentales.

El funcionamiento de este tipo de biosensores está influenciado por el potencial aplicado ( $E_{ap}$ ), la concentración de mediador en la celda de medida ( $C_{Fe}$ ) y la actividad enzimática, que en gran parte depende a su vez de la concentración de glutaraldehído ( $C_{glut}$ )[21]. Por este motivo fueron estas variables las seleccionadas para estudiar su influencia en la respuesta.

Esta optimización se realizó mediante la metodología del diseño de experimentos, a través de un diseño central compuesto  $2^3$  (sección VI.3). A continuación se presentan los valores correspondientes a los niveles alto, bajo y al punto central para cada uno de los factores estudiados, que fueron seleccionados según bibliografía y los experimentos previos descritos,

|                               |                         |                                          |
|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| $E_{ap} (+) = 0.1 \text{ V}$  | $C_{glut} (+) = 3.9 \%$ | $C_{Fe} (+) = 0.15 \text{ mmol dm}^{-3}$ |
| $E_{ap} (-) = -0.3 \text{ V}$ | $C_{glut} (-) = 1.1 \%$ | $C_{Fe} (-) = 0.05 \text{ mmol dm}^{-3}$ |
| $E_{ap} (0) = -0.1 \text{ V}$ | $C_{glut} (0) = 2.5 \%$ | $C_{Fe} (0) = 0.10 \text{ mmol dm}^{-3}$ |

La concentración de glucosa en celda en todos los cronoamperogramas registrados para el diseño de experimentos fue de  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla VIII.3.1. Para poder analizar los resultados de forma correcta, las experiencias en las que no se obtuvo respuesta alguna se cuantificaron con un valor de intensidad de  $0.01 \mu\text{A}$ .

Los resultados obtenidos, presentados en forma de ANOVA, se muestran en la Tabla VII.3.2.

**Tabla VIII.3.1.:** Resultados del diseño central compuesto  $2^3$  para la optimización de los parámetros experimentales en un sensor bienzimático para la determinación de glucosa ( $C_{GLU} = 10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

| $E_{ap}$ (V) | $C_{glut}$ (%) | $C_{Fe}$ (mmol $\text{dm}^{-3}$ ) | $I$ ( $\mu\text{A}$ ) |
|--------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|
| -0.30        | 1.10           | 0.050                             | 7.10                  |
| 0.10         | 1.10           | 0.050                             | 0.01                  |
| -0.30        | 3.90           | 0.050                             | 11.20                 |
| 0.10         | 3.90           | 0.050                             | 0.01                  |
| -0.30        | 1.10           | 0.150                             | 12.70                 |
| 0.10         | 1.10           | 0.150                             | 0.01                  |
| -0.30        | 3.90           | 0.150                             | 12.20                 |
| 0.10         | 3.90           | 0.150                             | 0.01                  |
| -0.44        | 2.50           | 0.100                             | 0.01                  |
| 0.24         | 2.50           | 0.100                             | 0.01                  |
| -0.10        | 0.15           | 0.100                             | 6.10                  |
| -0.10        | 4.85           | 0.100                             | 6.10                  |
| -0.10        | 2.50           | 0.016                             | 12.90                 |
| -0.10        | 2.50           | 0.184                             | 16.50                 |
| -0.10        | 2.50           | 0.100                             | 11.60                 |
| -0.10        | 2.50           | 0.100                             | 13.10                 |
| -0.10        | 2.50           | 0.100                             | 17.60                 |

Tanto en el ANOVA (Tabla VIII.3.2) como en el diagrama de Pareto (Fig. VIII.3.2), puede observarse que sólo el potencial de trabajo, a través de su interacción cuadrática, es una variable significativa ( $P < 0.05$ ), siendo el modelo adecuado para ajustar los datos experimentales puesto que no se obtuvo fallo de ajuste ( $P > 0.05$ ) para un nivel de confianza del 95%.

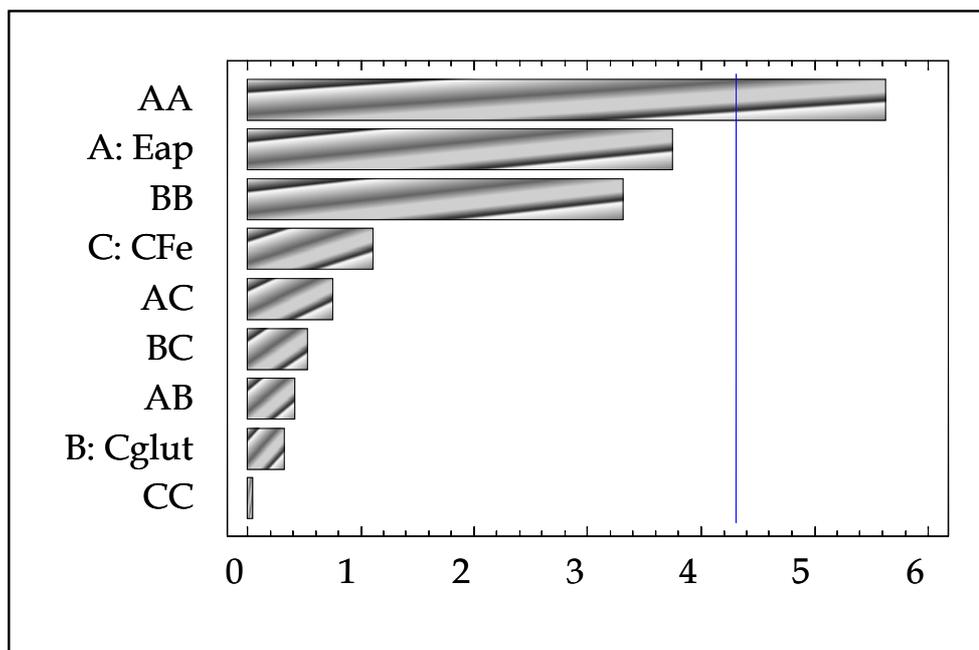
La Figura VIII.3.3 muestra la superficie de respuesta obtenida al fijar el valor de concentración de mediador en el correspondiente al punto central. Puede observarse que se alcanza un máximo claramente definido para los siguientes valores de las variables experimentales,

**Tabla VIII.3.2:** ANOVA de los datos obtenidos mediante la metodología de diseño de experimentos.

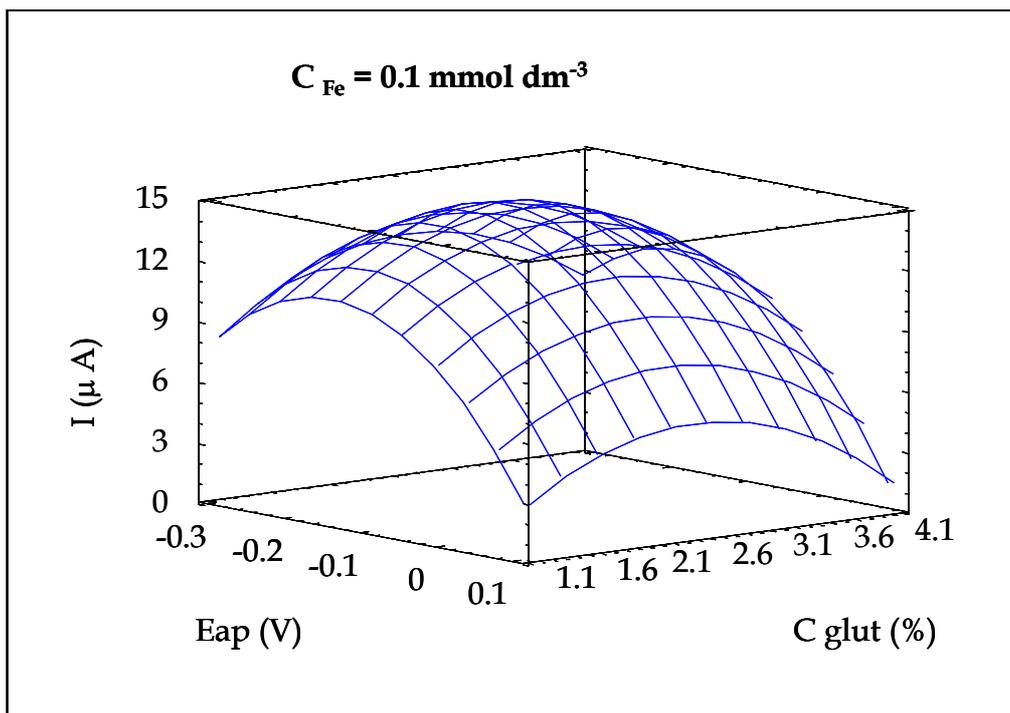
S.C., suma de cuadrados; G.L., grados de libertad; M.C., media de cuadrados;  $F_{exp} = MC_{factor}/MC_{error}$ ;  $P_{actual}$ , nivel de probabilidad; \*Factores significativos a  $\alpha = 0.05$ .

| Efecto               | S.C.   | G.L. | M.C.   | F <sub>exp</sub> | P <sub>actual</sub> |
|----------------------|--------|------|--------|------------------|---------------------|
| A : E <sub>ap</sub>  | 136.63 | 1    | 136.63 | 14.01            | 0.0645              |
| B: C <sub>glut</sub> | 0.95   | 1    | 0.95   | 0.10             | 0.7846              |
| C: C <sub>Fe</sub>   | 11.73  | 1    | 11.73  | 1.20             | 0.3872              |
| AA                   | 308.20 | 1    | 308.20 | 31.61            | <b>0.0302*</b>      |
| AB                   | 1.62   | 1    | 1.62   | 0.17             | 0.7230              |
| AC                   | 5.45   | 1    | 5.45   | 0.56             | 0.5328              |
| BB                   | 106.41 | 1    | 106.41 | 10.91            | 0.0807              |
| BC                   | 2.65   | 1    | 2.65   | 0.27             | 0.6544              |
| CC                   | 0.01   | 1    | 0.01   | 0.00             | 0.9759              |
| Fallo de ajuste      | 103.97 | 5    | 20.79  | 2.13             | 0.3493              |
| Error puro           | 19.50  | 2    | 9.75   |                  |                     |
| Total (corr)         | 664.64 | 16   |        |                  |                     |

$$R^2 = 0.81423$$



**Figura VIII.3.2:** Diagrama de Pareto para la variable respuesta.

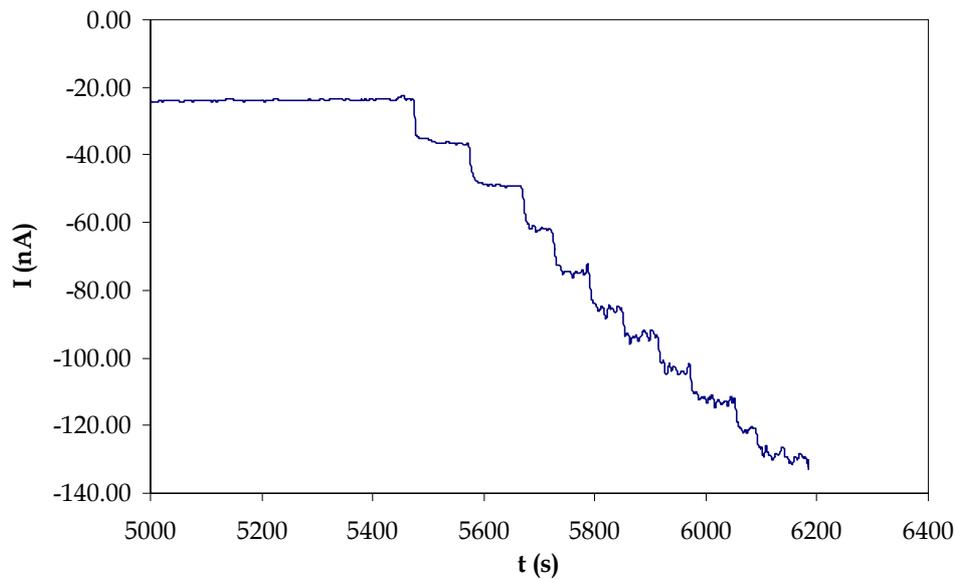


**Figura VIII.3.3:** Superficie de respuesta para la variable respuesta obtenida para el valor correspondiente al punto central de mediador.

$$C_{Fe}, 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \quad C_{glut}, 2.6 \% \quad E_{ap}, - 0.16 \text{ V}$$

Estos fueron, por tanto, los valores de las variables experimentales seleccionados como óptimos para la determinación de glucosa, utilizando los biosensores descritos.

En la figura VIII.3.4 se muestra un cronoamperograma realizado en las condiciones óptimas para este biosensor.



**Figura VIII.3.4:** Cronoamperograma registrado con un sensor bienzimático para la determinación de glucosa, utilizando chips serigráficos. Cada adición corresponde a  $10 \mu\text{l}$  de una solución  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  de glucosa.

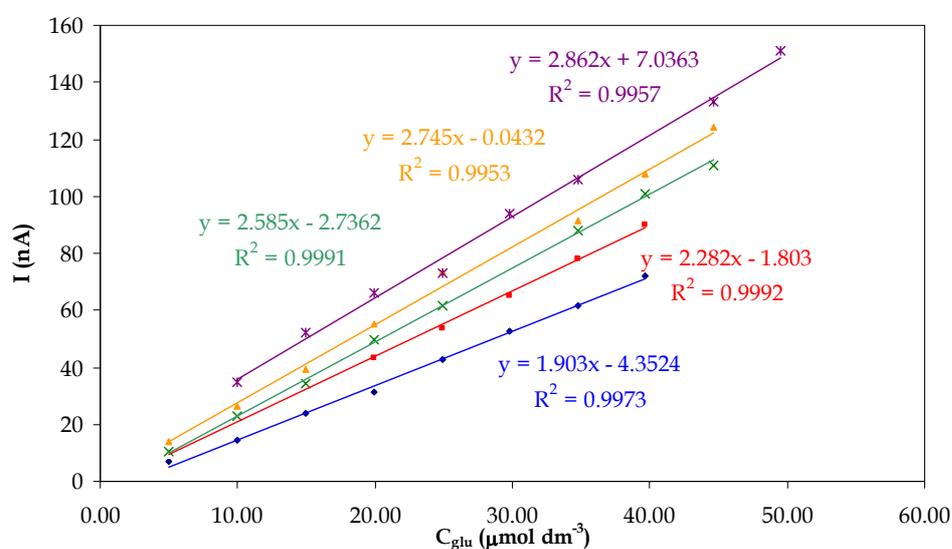
### VI.3.4.- Estabilidad del biosensor.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, la estabilidad de un biosensor está influenciada en gran medida por la contaminación de la membrana. En este tipo de inmovilización se debe tener en cuenta además el “leaking” o disolución de la enzima en la solución.

Como en los casos anteriores, la estabilidad de este biosensor se evaluó mediante un estudio de la repetibilidad y reproducibilidad de las rectas de calibrado construidas con estos dispositivos.

La repetibilidad se estudió mediante diferentes medidas amperométricas realizadas con un mismo biosensor fabricado en las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior.

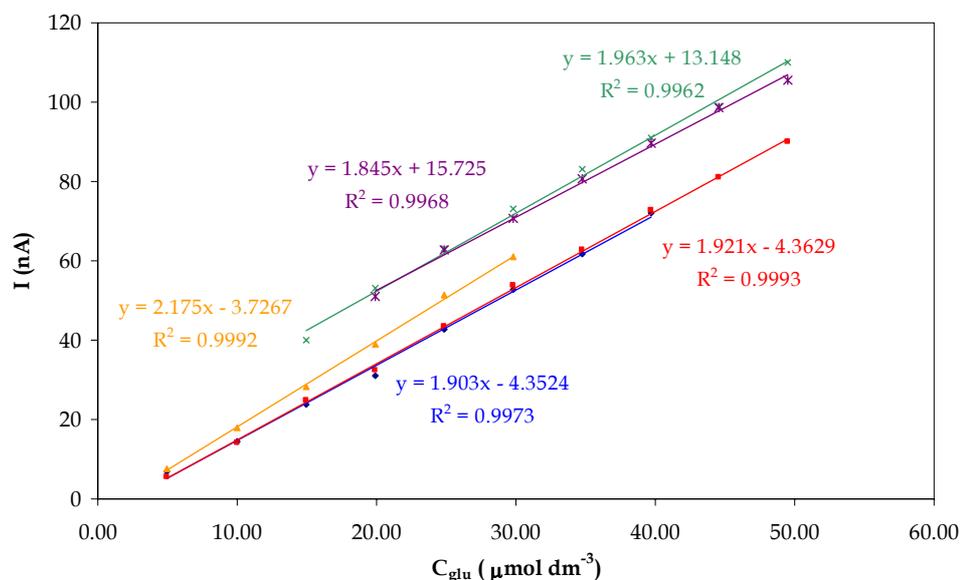
En la figura VIII.4.1 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas, tomando un intervalo de concentración de glucosa de  $4.9 \mu\text{mol dm}^{-3}$  a  $49 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .



**Figura VIII.4.1:** Puntos experimentales y rectas de calibración obtenidas para estimar la repetibilidad del biosensor para la determinación de glucosa, realizados a lo largo de un mismo día.

Dichas rectas fueron óptimamente evaluadas, eliminando los puntos anómalos mediante LMS (sección VI.4.1), y sus pendientes se utilizaron para estimar la desviación estándar residual (RSD) asociada, que resultó de 15.4% ( $n=5$ ,  $\alpha = 0.05$ ). Este relativamente elevado valor puede atribuirse al proceso de "leaking" asociado a este tipo de inmovilización.

La reproducibilidad del biosensor se comprobó analizando las pendientes de de cinco rectas en el mismo intervalo de concentración que el utilizado para el estudio de la repetibilidad, utilizando diferentes biosensores (Fig VIII.4.2).



**Figura VIII.4.2:** Puntos experimentales y rectas de calibración obtenidas para estimar la reproducibilidad del biosensor para la determinación de glucosa.

La RSD asociada a dichas pendientes fue de 6.47% (n=5). Teniendo en cuenta que la fabricación de esta membrana no es un proceso automatizado, se puede afirmar que la reproducibilidad de estos dispositivos es excelente.

## VIII.5. Límite de detección.

De acuerdo con el procedimiento descrito en capítulos anteriores para el cálculo del LOD, la primera etapa consiste en la determinación de una relación lineal entre la concentración de glucosa y la señal.

Se realizaron diferentes calibrados en las condiciones optimizadas previamente, que se utilizaron, una vez eliminados los puntos anómalos, para la construcción de las curvas de detección mediante el programa DETARCHI [19].

El LOD medio obtenido para  $\alpha = \beta = 0.05$  y una réplica fue de  $4.4 \pm 0.1$   $\mu\text{mol dm}^{-3}$  ( $n = 4$ ).

### **VIII.6. Determinación de glucosa en muestras reales.**

Una vez demostrado el buen funcionamiento de estos biosensores en muestras sintéticas, se analizó la posibilidad de su aplicación en la industria vitivinícola mediante la medida de la concentración de glucosa en mostos.

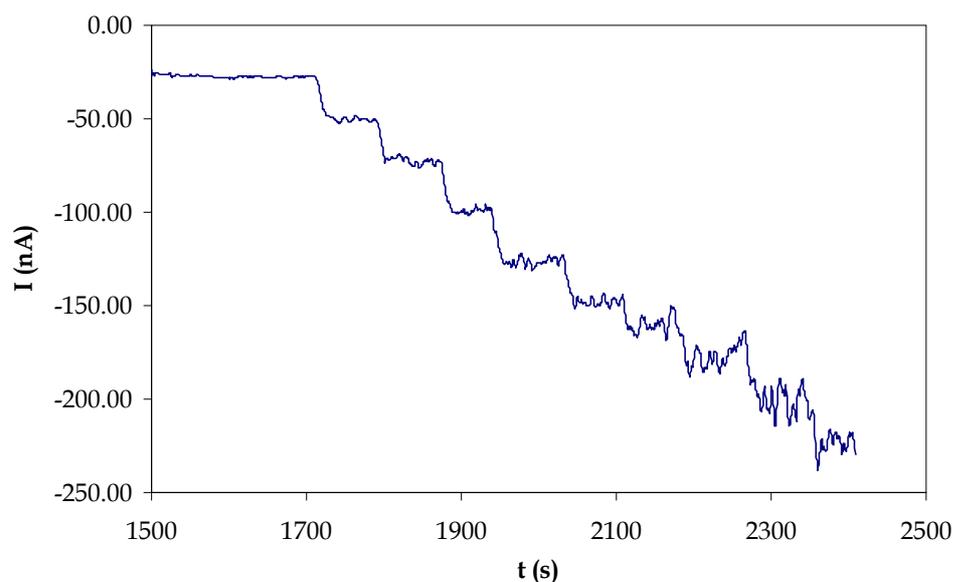
El mosto fue facilitado por el "institut català del vi" (INCAVI), así como la concentración de azúcares totales expresado en °Brix, calculados mediante refractometría. Éste es un método indirecto, a través del cual se puede determinar la concentración de azúcares totales en el mosto mediante la medida del índice de refracción.

Los azúcares predominantes en la uva son la glucosa y la fructosa, en una relación de 1:1 [22]. La concentración de azúcares totales es la suma de estos dos analitos, y por tanto los °Brix dependen de ellos. Existen tablas en las que se relacionan estos dos parámetros [23], multiplicando los °Brix por el factor adecuado se puede obtener la concentración de azúcares totales en  $\text{g l}^{-1}$ .

Este factor es diferente según el método utilizado para determinar la concentración de glucosa y fructosa.

Se facilitaron cuatro muestras de mosto, tres de las cuales se utilizaron para buscar esta relación entre los °Brix y la concentración de glucosa determinada con los biosensores desarrollados.

Todos los análisis se realizaron mediante adición estándar (Fig VIII.6.1), adicionando 10  $\mu\text{l}$  de una solución 5  $\text{mmol dm}^{-3}$  de glucosa sobre las muestras de mosto.



**Figura VIII.6.1:** *Cronoamperograma correspondiente a una de las adiciones estándar realizadas para la determinación de glucosa en mosto, en las condiciones de las variables experimentales optimizadas previamente.*

En la tabla VIII.6.1, se muestra el factor calculado a partir del valor de °Brix facilitados por el INCAVI, y la concentración de glucosa calculada con los biosensores.

**Tabla VIII.6.1:** Cálculo del factor que relaciona °Brix y concentración de glucosa, para este tipo de biosensores.

| Mosto               | °Brix | Conc. Glucosa calculada (g/l) | Factor calculado |
|---------------------|-------|-------------------------------|------------------|
| 68-05               | 19.5  | 82.39±12                      | 4.23             |
| OTA 3               | 18.7  | 87.3±6.6                      | 4.67             |
| OTA 8               | 23.6  | 96.6±9.5                      | 4.09             |
| <b>factor medio</b> |       |                               | <b>4.33</b>      |

La muestra de mosto restante, de las facilitadas por el INCAVI, se utilizó como test. Así, se calculó la concentración de glucosa en esta muestra mediante adicción estándar, el valor obtenido fue de  $92.86 \pm 10.2 \text{ g l}^{-1}$ . A través del factor medio de 4.33 (RSD 6.20 %,  $n = 3$ ,  $\alpha = 0.05$ ), se calcularon los °Brix de esta muestra ( $21.4 \pm 2.4$ ). Los resultados obtenidos presentan gran concordancia con los facilitados por el instituto de referencia (21.3 °Brix).

## VIII.- Bibliografía

1. C. A. Galan-Vidal, J. Munoz, C. Dominguez, y S. Alegret, *Chemical sensors, biosensors and thick-film technology*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **1995**. 14(5): p. 225-231.
2. L. Tymecki, E. Zwierkowska, y R. Koncki, *Screen-printed reference electrodes for potentiometric measurements*. Analytica Chimica Acta, **2004**. 526(1): p. 3-11.
3. G. Silva Nunes, G. Jeanty, y J.-L. Marty, *Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study*. Analytica Chimica Acta, **2004**. 523(1): p. 107-115.
4. J. P. Harty S. A. Wring, *Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **1997**. 16(2): p. 89-103.
5. F. Tiany G. Zhu, *Bienzymatic amperometric biosensor for glucose based on polypyrrole/ceramic carbon as electrode material*. Analytica Chimica Acta, **2002**. 451(2): p. 251-258.
6. B. Eggins, *Biosensors, an introduction*. **1996**: John Wiley & Sons Ltd.
7. P. Monsan, *Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization*. Journal of Molecular Catalysis, **1978**. 3(5): p. 371-384.
8. J. J. Xu, D. M. Zhou, y H. Y. Chen, *A reagentless hydrogen peroxide biosensor based on the coimmobilization of thionine and horseradish peroxidase by their cross-linking with glutaraldehyde on glassy carbon electrode*. Electroanalysis, **1998**. 10(10): p. 713-716.
9. D. Compagnoney G. G. Guilbault, *Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP*. Analytica Chimica Acta, **1997**. 340(1-3): p. 109-113.
10. I. Paolicchi, O. Domínguez Renedo, M. Alonso Lomillo, y M. Arcos Martínez, *Application of an optimization procedure in adsorptive stripping voltammetry for the*

- determination of trace contaminant metals in aqueous medium. ANALYTICA CHIMICA ACTA, 2004. 511(2): p. 223-229.*
11. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, y S. Alegret, *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. Sensors and Actuators B-Chemical, 2000. 69(1-2): p. 153-163.*
  12. L. Betancor, F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. D.-O. C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, y J. M. Guisan, *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports. Enzyme and Microbial Technology. In Press, Corrected Proof.*
  13. S. S. Razola, E. Aktas, J. C. Vire, y J. M. Kauffmann, *Reagentless enzyme electrode based on phenothiazine mediation of horseradish peroxidase for subnanomolar hydrogen peroxide determination. Analyst, 1999. 125(1): p. 79-85.*
  14. S. Shah, A. Sharma, y M. N. Gupta, *Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. Analytical Biochemistry. In Press, Corrected Proof.*
  15. I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, y K. C. Waldron, *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. Biotechniques, 2004. 37(5): p. 790-+.*
  16. GPES, *General Purpose Electrochemical System for Windows, 4.9. ver. 4.9, EcoChemie B.V.: Utrech, Holanda 2002*
  17. STATGRAPHICS, *STATGRAPHICS PLUS for Windows, Version 5.1. Copy 1994-2001, Statistical Graphics Corp.*
  18. P. J. Rousseeuw y A. M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection. , 1989: p. Wiley. New York.*
  19. L. Sarabiay M. C. Ortiz, *Detarchi - A Program For Detection Limits With Specified Assurance Probabilities And Characteristic Curves Of Detection. Trac-Trends In Analytical Chemistry, 1994. 13(1): p. 1-6.*
  20. M. A. Alonso Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, y F. J. Muñoz Pascual, *Biosensor based on platinum chips for glucose determination. Analytica Chimica Acta, 2005. 547(2): p. 209-214.*
  21. B. Wu, G. Zhang, S. Shuang, y M. M. F. Choi, *Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. Talanta, 2004. 64(2): p. 546-553.*

22. M. Ruiz-Hernandez, *Las variedades de vid y la calidad de los vinos*, ed. E. A. Madrid Vicente. **2001**, Madrid.
23. M. A. O. Amerine, C.S., *Análisis de vinos y mostos*, ed. E. Acribia. **1976**, Zaragoza.



De los resultados de los capítulos precedentes se extraen las siguientes conclusiones,

1. La tecnología de capa delgada, basada en silicio, ha demostrado ser eficaz en el diseño y la fabricación de distintos tipos de microtransductores amperométricos. En la caracterización de los mismos, los mejores resultados se obtuvieron con el dispositivo de diseño circular, con una reproducibilidad en la respuesta amperométrica, en términos de desviación estándar residual, de 1.19 % ( $n = 10$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

2. A su vez, la técnicas serigráficas o de capa gruesa son aptas para la fabricación de dispositivos miniaturizados, incluso cobran especial relevancia en el caso del diseño de dispositivos miniaturizados y desechables. La caracterización de los dos tipos de transductores amperométricos que fueron fabricados mediante esta tecnología, no presentó diferencias significativas entre ellos, con reproducibilidades en torno al 7.7 % ( $n = 10$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

3. La combinación de las tecnologías de capa delgada y gruesa, permitió la integración de un electrodo de pseudo-referencia basado en tintas de Ag/AgCl, en los chips amperométricos que carecían de él. Este electrodo presenta una deriva inferior a  $0.25 \text{ mV h}^{-1}$  para una concentración de  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl y es estable durante más de 10 horas. La respuesta que presenta ante variaciones de la concentración de cloruros tiene un comportamiento típico nernstiano, con pendientes de 57 mV. Estas características lo definen como

apto para su utilización en la realización de medidas voltamperométricas, como bien se ha demostrado.

4. La clorinización, mediante voltamperometría cíclica, de plata electrodepositada sobre el platino del chip original también conduce a la formación de un electrodo de pseudo-referencia viable para la realización de medidas electroquímicas. Estos electrodos presentan una deriva inferior a  $0.1 \text{ mV h}^{-1}$  en una solución de  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl y son estables durante más de 10 horas, siendo su respuesta nernstiana con pendientes próximas a  $50 \text{ mV}$  en la representación  $E \text{ (V) vs } \log a_{\text{Cl}}$ . Estos electrodos son viables para la realización de medidas voltamperométricas, obteniendo resultados satisfactorios.

5. En el caso de la fabricación de electrodos de pseudo-referencia basados en óxidos de iridio y plata, el potencial medido en una solución  $0.05 \text{ mol dm}^{-3}$  de fosfato pH 7 no es estable, presentando derivas comprendidas entre  $10$  y  $30 \text{ mV}$ . Estas características no son deseables en este tipo de electrodos por lo que se desaconseja su utilización en el registro de medidas electroquímicas.

6. Los transductores desarrollados mediante técnicas de capa delgada, se emplearon en la construcción de biosensores para la determinación de analitos, tales como glucosa y etanol, tanto en muestras sintéticas como reales. La inmovilización de los enzimas en el electrodo de trabajo a través de la electrogeneración de un polímero conductor, conduce a resultados totalmente satisfactorios.

7. El sensor bienzimático basado en GOx y HRP para la determinación de glucosa, precisa de un mediador para amplificar la señal registrada y eliminar las posibles interferencias de otros analitos.

8. Las variables que influyen en la respuesta amperométrica de estos biosensores fueron optimizadas a través de la metodología del diseño de experimentos. Así, al utilizar Meldola's blue como mediador, los valores obtenidos para los factores optimizados fueron,  $E_{ap} = -0.017 \text{ V}$ ,  $C_{MB} = 0.38 \text{ mmol dm}^{-3}$  y  $C_{Py} = 0.056 \text{ mol dm}^{-3}$ . En el caso de utilizar ferrocianuro, los valores optimizados fueron,  $C_{Enz} = 0.056\%$ ,  $C_{Fe} = 7 \text{ mmol dm}^{-3}$  y  $C_{Py} = 0.039 \text{ mol dm}^{-3}$ .

9. La repetibilidad y reproducibilidad obtenidas para este tipo de biosensores es de 3.71 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y 15 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ), respectivamente, en el caso de utilizar Meldola's blue como mediador y de 7.09 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y 9.12 % ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ), respectivamente, para ferrocianuro.

10. Es posible determinar la concentración de glucosa en mosto mediante adición estándar utilizando en sensor bienzimático basado en ferrocianuro como mediador.

11. Para la determinación de alcohol en vino, se desarrolló un sensor bienzimático basado en AOX y HRP, que precisa ferrocianuro como mediador. Las variables optimizadas mediante el diseño de experimentos son,  $E_{ap} = -0.2 \text{ V}$ ,  $C_{Enz} = 2.5 \text{ mg ml}^{-1}$  y  $C_{Fe} = 7.5 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

12. Estos biosensores presentan una repetibilidad de 9.03 %, ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0.05$ ) una reproducibilidad de 6.09% ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y un límite de detección medio de  $2.9 \pm 0.4 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $n = 3$   $\alpha = 0.05$  y una réplica).

13. Utilizando estos biosensores y mediante adición estándar es posible determinar la cantidad de alcohol presente en muestras diferentes de vino blanco, obteniendo resultados satisfactorios.

14. Los transductores serigráficos facilitan la construcción de biosensores mediante inmovilización de los enzimas GOx y HRP por entrecruzamiento con gluteraldehído y BSA. Utilizando ferrocianuro en solución como mediador, estos dispositivos se caracterizaron y se utilizaron para medir la concentración de glucosa en mosto.

15. Los valores óptimos de variables experimentales que afectan a la calidad de la señal electroquímica fueron,  $C_{Fe} = 0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $E_{ap} = -0.16 \text{ V}$  y  $C_{glut} = 2.6 \%$ .

16. Estos dispositivos presentan una repetibilidad, en términos de desviación estándar residual, del 15.4 % ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0.05$ ), una reproducibilidad del 6.47 % ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0.05$ ) y un límite de detección medio de  $4.4 \pm 0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$  y una réplica).

17. Utilizando estos dispositivos se determinó la cantidad de azúcares totales, en ° Brix, presente en muestras diferentes de mostos con resultados satisfactorios.