

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ELECTRODOS DE GRAFENO MODIFICADOS Y
SU POSIBLE APLICACIÓN COMO SENSOR ELECTROQUÍMICO DE GLIADINA.**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Luis Alejandro Acevedo
Fernández, para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, Febrero, 2018.

Yo, Dr. José Daniel Martínez, Profesor e Investigador del Centro de Equilibrios en Solución de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ELECTRODOS DE GRAFENO MODIFICADOS Y SU POSIBLE APLICACIÓN COMO SENSOR ELECTROQUÍMICO DE GLIADINA”.

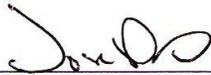
Que presenta el Br. Luis Alejandro Acevedo Fernández, C.I 2133789; para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el laboratorio de Electroquímica del Centro de Equilibrios en Solución de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2017 y 2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 22 de febrero de 2018



Dr. José Daniel Martínez

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela (UCV), como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ELECTRODOS DE GRAFENO MODIFICADOS Y SU POSIBLE APLICACIÓN COMO SENSOR ELECTROQUÍMICO DE GLIADINA". Presentado por el Br. Luis Alejandro Acevedo Fernández, C.I 2133789; certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Dr. José Daniel Martínez

(Tutor)



Dra. Lorean Madriz

(Jurado)



Dra. Mary Carmen Bullón

(Jurado)

RESUMEN

Se llevó a cabo la modificación superficial de electrodos de grafito usando óxido de grafeno y nanopartículas de Fe_xO_y o Cobre, para evaluar la posible detección de gliadina mediante la técnica de Voltamperometría de Onda Cuadra (VOC). Los distintos agentes modificantes fueron sintetizados vía electroquímica; y luego, caracterizados por diversas técnicas (DRX, DLS, Espectroscopía UV-Visible y MEB) con el fin de obtener información acerca de la forma, tamaño y composición relativa. De éstos, únicamente la metodología para sintetizar NpsCu no funcionó bajo las condiciones de trabajo definidas. Por su parte, se construyeron tres tipos de electrodo modificados, nombrados según el modificante usado: (a) GO, electrodos con óxido de grafeno (b) GO/Fe, electrodos con óxido de grafeno y nanopartículas de óxido de hierro y (c) GO/Cu, electrodos con óxido de grafeno y partículas de cobre.

La gliadina usada para realizar las pruebas fue obtenida a partir de muestras de harina de trigo comercial marca Robin Hood, y extraída de ésta con base en las propiedades de solubilidad de las distintas proteínas que componen a dicha harina. Sin embargo, por la inactividad electroquímica característica de los aminoácidos que conforman a la gliadina, el enfoque del proceso de detección estuvo dirigido hacia la inhibición de la señal de oxidación del par electroactivo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Así, cuando el electrodo de trabajo consistía en GO/Fe, la adición de gliadina generaba una disminución proporcional de la corriente de pico anódico del Voltamperograma de OC. Para los electrodos de GO y GO/Cu se presentó un comportamiento aleatorio en las respuestas obtenidas, y por ende, se descartaron para el posterior estudio de cuantificación.

Usando electrodos de GO/Fe se construyeron diversas curvas de calibrado; a partir de las cuales, se procedió al cálculo de las cifras de méritos más importantes en los sensores: sensibilidad ($8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$), límite de detección (5,5 ppm), límite de cuantificación (22,2 ppm), rango lineal (0,0 – 48,4 ppm). Además, la reproducibilidad del método usando distintos electrodos fue del 13,92%. Estos resultados son prometedores para el desarrollo de un sensor de gliadina con aplicaciones a nivel industrial, pues se ha definido, para los alimentos “exentos de gluten”, un valor límite entre 10 ppm a 20 ppm, según la región geográfica.

Palabras Claves: Gliadina, Electroanalítica, Voltamperometría de onda cuadrada, Electrodos modificados, Óxido de grafeno, Nanopartículas, Cifras de mérito.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1. La Enfermedad Celíaca	3
1.2. El Gluten.....	5
1.3. ANTECEDENTES.....	9
1.4. FUNDAMENTOS ELECTROQUÍMICOS.....	22
1.4.1. Electroanálisis.....	22
1.4.2. Sensores Electroquímicos.....	24
1.5. Técnicas Empleadas	27
1.5.1. Voltamperometría.....	27
1.5.2. <i>Voltamperometría Cíclica</i>	28
1.5.3. Voltamperometría de Onda Cuadrada	32
1.5.4. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE-SDS).....	34
1.5.5. Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	35
1.5.6. Espectroscopía UV-Visible.....	37
1.5.7. Difracción de Rayos X.....	39
1.5.8. Microscopía Electrónica de Barrido.....	40
CAPÍTULO II	43
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	43
2.1. Reactivos Empleados.....	43
2.2. Equipos Empleados.....	44

2.3.	Procedimiento Experimental.....	46
2.3.1.	Extracción de Gliadina a partir de muestras de harina de trigo	46
2.3.3.	Síntesis de nanopartículas de óxido de Hierro.....	49
2.3.4.	Síntesis de nanopartículas de Cobre.....	50
2.3.5.	Preparación de los Electrodo: Modificación de la Superficie.....	51
2.3.6.	Detección de la Gliadina.....	53
2.3.7.	Cuantificación de la gliadina a partir el electrodo de GO/Fe. Determinación de las cifras de mérito.....	54
2.3.8.	Procedimientos de reutilización del electrodo GO/Fe.....	55
2.3.9.	Estudio de la Selectividad: Pruebas de Interferencias.....	56
2.3.10.	Análisis de una Muestra Real.....	56
CAPÍTULO III	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1.	Análisis de las Metodologías para la obtención de gliadina a partir de muestras de harina de trigo	57
3.1.1.	Metodología aplicada por Dupont. et al: ⁶⁴	57
3.1.2.	Metodología aplicada por Eckert: ⁶⁵	58
3.1.3.	Caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	59
3.2.	Análisis del método de síntesis del Óxido de Grafeno GO.....	61
3.2.1.	Caracterización de GO por microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):.....	62
3.2.2.	Caracterización del GO por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.....	64
3.2.3.	Caracterización del GO por Difracción de Rayos X.....	65
3.3.	Análisis del método de síntesis de las nanopartículas de Fe _x O _y	69
3.3.1.	Caracterización de las Nanopartículas de Fe _x O _y por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):.....	71
3.3.2.	Caracterización de las Nanopartículas de Fe _x O _y por DLS.....	74
3.3.3.	Caracterización de las Nanopartículas de Fe _x O _y por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.....	75
3.4.	Análisis del método de síntesis de las nanopartículas de Cobre.....	76
3.4.1.	Caracterización de las Nanopartículas de Fe _x O _y por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):.....	76

3.4.2.	Caracterización de Nps Cu por DLS	78
3.4.3.	Caracterización de las Nanopartículas de Cu por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.....	78
3.5.	Análisis de la Preparación de los Electrodo de Trabajo.....	79
3.5.1.	Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS):.....	80
3.5.2.	Caracterización de electrodos por Voltamperometría Cíclica (VC).....	89
3.6.	Detección de gliadina mediante voltamperometría de onda cuadrada.	95
3.6.1.	Optimización de la señal de oxidación del par electroactivo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.	95
3.6.2.	Respuesta de los electrodos de trabajo en presencia de la gliadina.	97
3.7.	Quantificación de gliadina a través de voltamperometría de onda cuadrada. Determinación de las figuras de mérito estadístico.....	106
3.7.1.	Análisis de la precision.	106
3.7.2.	Curvas de calibración para las mediciones que implicaban el uso de electrodos de GO/Fe. 110	
3.7.3.	Reproducibilidad en las curvas de calibración.	116
3.8.	Pruebas de Reutilización del Electrodo GO/Fe	119
3.8.1.	Análisis del Método 1.....	119
3.8.2.	Análisis del Método 2.....	121
3.9.	Pruebas de Selectividad.	124
3.10.	Análisis de la Muestra Real	125
CAPÍTULO IV.....		127
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		127
4.1.	Conclusiones.....	127
4.2.	Recomendaciones.....	129
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los distintos tipos de proteínas que constituyen al gluten. ¹³6	6
Tabla 2. Información concerniente a los reactivos empleados durante la realización del proyecto.....43	43
Tabla 3. Electrodo de trabajo preparados a partir de la modificación superficial de un electrodo de grafito.....52	52
Tabla 4. Condiciones de la voltamperometría de onda cuadrada para evaluar la detección de la gliadina por parte de los electrodos de grafito modificados superficialmente.53	53
Tabla 5. Peso molecular (kDa) de los distintos tipos de gliadina, reportado por Eckert. ⁶⁵60	60
Tabla 6. Características de los picos que componen al pico (002) del espectro de GO. ⁶⁸	68
Tabla 7. Tamaño de cristal y número de capas de grafeno de los Picos de la Figura 5. ⁶⁹	69
Tabla 8. Parámetros asociados a la curva de calibración de la Figura 46.112	112
Tabla 9. Cifras de méritos de varios ensayos y sensores de Gliadina115	115
Tabla 10. Parámetros asociados a las curvas de calibración de la <i>Figura 47</i>118	118
Tabla 11. Parámetros asociados a las curvas de calibración de la <i>Figura 69</i>123	123
Tabla 12. Resultados de las Pruebas de Interferencias usando como electrodo de trabajo al GO/Fe.....124	124
Tabla 13. Determinación de gliadina en la muestra de Harina de Trigo Marca Robin Hood, usando un electrodo de GO/Fe.....126	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo estructural para el gluten del trigo, en el cual las subunidades HMW constituyen la cadena principal que interactúa con otras proteínas del gluten mediante enlaces disulfuro (subunidades LMW) e interacciones no covalentes (gliadinas).	8
Figura 2. Ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sandwich. ²²	10
Figura 3. (A) Voltamperograma de pulso diferencial que muestra la señal de (a) DMSO-ABS en ausencia de gluten, (b) 20 µg/mL de gluten, (c) 40 µg/mL de gluten, (d) 60 µg/mL de gluten, (e) 80 µg/mL de gluten, y (f) 100 µg/mL de gluten. (B) Curva de calibración que representa los cambios de la señal de oxidación del gluten, en presencia de distintos niveles de concentraciones de gluten en el rango de 20 a 100 µg/mL. ³⁰	15
Figura 4. (a) Simulación de capas de Grafeno (b) Micrografía de Grafeno obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión	17
Figura 5. Voltametría cíclica del electrodo de Ni _{0,69} Co _{0,64} S ₂ /rGO en una solución de 0,3 M de NaOH con 1mM de glucosa, a varias velocidades de escaneo (desde la curva interna a la más externa): 5, 10, 20, 30, 50, 80 y 100 mV.s ⁻¹ . ³³	19
Figura 6. Esquema de construcción del inmunosensor electroquímico de gliadina propuesto por Shekin, F. et al. ³⁷	20
Figura 7. Curvas de calibrado del análisis de gliadina en 60% de etanol con el sensor de QCM. Las líneas sólidas representan la curva de calibrado del sensor de QCM con el chip modificado con nanopartículas de Au; por su parte, la línea de regresión cuyo trazo es pespunteado fue obtenida para el caso en que el chip estaba libre de Nps. ⁴³	22

Figura 8. Clasificación de las Técnicas Electroquímicas ⁴⁴	23
Figura 9. Esquema de un Sensor.....	25
Figura 10. Señal de Excitación en una voltametría cíclica. ⁴⁹	29
Figura 11. Voltamperograma cíclico para una reacción reversible.....	30
Figura 12. Ejemplo de la señal de excitación aplicada en una voltamperometría de pulso diferencial. ⁴⁵	32
Figura 13. Voltamperograma de onda cuadrada para una reacción reversible de transferencia electrónica. La curvas A y B representan a las corrientes <i>directa</i> e <i>inversa</i> , respectivamente; la curva C viene a ser la corriente neta da por la diferencia Δi de las corrientes anteriores ⁴⁵	33
Figura 14. Dispersión Dinámica de Luz producto de la dispersión de radiación incidente λ_0 sobre una muestra.	36
Figura 15. Esquema de la absorbancia de radiación por parte de una solución de concentración C confinada en una celda de longitud b. ⁵⁶	37
Figura 16. Efecto de Resonancia del Plasmón Superficial.....	39
Figura 17. Difracción de los Rayos X incidentes en los planos de Red Cristalina.....	40
Figura 18. Esquema del funcionamiento y las partes de un microscopio electrónico de barrido.....	41
Figura 19. Imagen del gel obtenido mediante PAGE-SDS. El último carril, identificado como "PM", posee marcadores de peso molecular, cuya masa (kDa) se indica en la escala de la izquierda.....	59
Figura 20. Micrografía del óxido de grafeno (GO) obtenida por MEB.	62

Figura 21. Espectro del óxido de grafeno soportado sobre una placa de Si, obtenido por la EDS.	63
Figura 22. Representación de una lámina de GO según el modelo de Lerf-Klinowski...64	64
Figura 23. Espectro UV-VIS de una dispersión de GO en agua.....65	65
Figura 24. Difractograma del GO (negro) y del Grafito (rojo)66	66
Figura 25. Análisis del pico (002) del difractograma de la muestra de GO.67	67
Figura 26. Diagrama de Pourbaix del Fe en agua y a 25°C. Las únicas especies sólidas son Fe, Fe ₃ O ₄ y Fe ₂ O ₃ . ⁶⁹	70
Figura 27. Micrografía de las partículas de Fe _x O _y , obtenida por MEB con una ampliación de 100 kx.....72	72
Figura 28. Micrografía de las partículas de Fe _x O _y , obtenida por MEB con una ampliación de 300 kx.....72	72
Figura 29. Espectro de las nanopartículas de óxido de hierro, obtenido por la técnica EDS.....73	73
Figura 30. Histograma de Intensidades en función de la distribución de tamaño de las naopartículas de Fe _x O _y74	74
Figura 31. Espectro UV-VIS de una dispersión de Nps Fe _x O _y en agua, a 28°C.75	75
Figura 32. Micrografía de las partículas de cobre, obtenida por MEB.....77	77
Figura 33. Espectro de las partículas de Cobre, obtenido por EDS.77	77
Figura 34. Histograma de Intensidades en función de la distribución de tamaño de las partículas de Cobre	78

Figura 35. Espectro UV-VIS de una dispersión de partículas de Cobre en agua, a 28°C.	79
Figura 36. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito, obtenida por MEB con un aumento de 10 kx.....	80
Figura 37. Micrografía de la superficie de electrodo de grafito, obtenida por MEB con un aumento de 20kx.....	81
Figura 38. Espectro de la superficie del electrodo de grafito, obtenido por EDS.....	81
Figura 39. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno, obtenida por MEB. En amarillo se ha señalado una zona desprovista del agente modificante.	82
Figura 40. Espectro de la superficie del electrodo de grafito modificado con GO, obtenido por EDS.	83
Figura 41. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y partículas de cobre, obtenida por MEB. En un círculo amarillo se ha delimitado a una de las partículas de Cobre.	84
Figura 42. Espectro EDS de la partícula de cobre señalada en la Figura 4.	84
Figura 43. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y $NpsFe_xO_y$, obtenida por MEB.....	85
Figura 44. Espectro EDS de la superficie del electrodo de grafito GO/Fe en la zona enmarcada en la Figura 43	86
Figura 45. Micrografías de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y $NpsFe_xO_y$ tras su utilización como sensor de Gliadina. El círculo amarillo delimita un cristal de KCl.....	87

- Figura 46. Espectro EDS de un cristal de KCl localizado en la superficie del *electrodo de grafito* GO/Fe (tras la detección de Gliadina).88
- Figura 47. Voltamperograma cíclico de una solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM), $K_3[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM) y KCl (al 1,00 M). Las mediciones fueron obtenidas usando un electrodo de grafito sin modificar a una velocidad de barrido de 100 mV/s y respecto al electrodo de pseudoreferencia de Ag.....90
- Figura 48. Voltamperograma cíclico de una solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM), $K_3[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM) y KCl (al 1,00 M). Las mediciones fueron obtenidas usando un electrodo de grafito sin modificar, a una velocidad de barrido de 100 mV/s y respecto al potencial formal de la reacción redox del par $[Fe(CN)_6]^{-4} / [Fe(CN)_6]^{-3}$ 90
- Figura 49. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito sin modificar en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.....92
- Figura 50. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno (GO) en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.92
- Figura 51. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con GO y Nps Fe_xO_y (GO/Fe) en (a) una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s. ...93
- Figura 52. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con GO y partículas de Cu (GO/Cu) en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.....93
- Figura 53. Réplicas de la señal de oxidación obtenidas mediante voltamperometría de onda cuadrada, para la reacción redox del par $[Fe(CN)_6]^{-4} / [Fe(CN)_6]^{-3}$ de la solución A usando un electrodo de grafito.97

Figura 54. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Fe, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.....	98
Figura 55. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) medida por un electrodo de GO/Fe, en función de la concentración de gliadina.....	99
Figura 56. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Cu, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.....	100
Figura 57. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) medida por un electrodo de GO/Cu, en función de la concentración de gliadina.....	101
Figura 58. Voltamperogramas de onda cuadrada de la señal de oxidación del par $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}$, como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Cu, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.	102
Figura 59. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par Cu/CuO) medida por un electrodo de GO/Cu, en función de la concentración de gliadina.....	103
Figura 60. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.	104
Figura 61. Propuesta de Mecanismo de acción del sensor. (A) La oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ ocurre sobre las Nps y, aunque en menor grado, sobre el GO. (B) La adsorción de la gliadina sobre la superficie, bloquea sitios activos e impide la oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$	105

Figura 62. Gráfico de los valores de la corriente de pico anódico de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, para distintas réplicas de una solución de gliadina al 11,0 ppm; usando un electrodo de grafito modificado GO/Fe.	107
Figura 63. Gráfico de los valores de la corriente de pico anódico de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, como respuesta de tres electrodos distintos de GO/Fe al medir la respuesta de una solución de Gliadina al 22,0 ppm.....	108
Figura 64. Gráfico de los valores de (A) I_{pa} y (B) I_{rpa} , de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, como respuesta de tres electrodos distintos de GO/Fe al medir la respuesta de una solución de gliadina al 22,0 ppm.....	109
Figura 65. Curva de Calibración de la corriente I_{rpa} en función de la concentración de gliadina depositada sobre un electrodo de GO/Fe	111
Figura 66. Curvas de Calibración de la corriente I_{rpa} en función de la concentración de gliadina depositada sobre electrodos distintos de GO/Fe.	117
Figura 67. Señales de Corriente I_{pa} obtenidas por el sensor reutilizado al medir distintas concentraciones de gliadina.	120
Figura 68. Comparación de las repuesta de I_{rpa} entre el sensor Original y el Sensor Reutilizado.....	121
Figura 69. Curvas de Calibrado de Calibrado del Electrodo de GO/Fe antes y después de su Reutilización, tas aplicar el método 2.	122

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
C	Concentración
d	Distancia de separación entre planos de una familia (hkl)
DER	Desviación estándar relativa
DLS	Dispersión Dinámica de Luz (por sus siglas en inglés)
DRX	Difracción de Rayos X
ΔE	Potencial de paso
EC	Enfermedad Celíaca
EDS	Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X.
E_{sw}	Amplitud de la onda cuadrada
Fe_xO_y	Óxido de hierro
GO	Óxido de grafeno
(hkl)	Índices de Miller
HMW	Alto peso molecular (por sus siglas en inglés)
I_b	Corriente de pico del blanco
I_{pa}	Corriente de pico anódico

I_{rpa}	Corriente relativa de pico anódico
LMW	Bajo peso molecular (por sus siglas en inglés)
λ	Longitud de onda
LOC	Límite de cuantificación (por sus siglas en inglés)
LOD	Límite de Detección (por sus siglas en inglés)
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
Nps	Nanopartículas
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial (por sus siglas en inglés)
UV	Ultravioleta
VC	Voltamperometría Cíclica
VOC	Voltamperometría de Onda Cuadrada

INTRODUCCIÓN

Existe un gran número de personas que sufren la enfermedad celíaca en la actualidad, representando el 1% de la población total. Debido a la ausencia de una cura, los celíacos deben suprimir de su dieta cualquier alimento que contenga gluten. El gluten está compuesto por dos conjuntos principales de proteínas: gliadinas y gluteninas; donde, las primeras son las causantes de los efectos nocivos en los celíacos. La necesidad de conocer el contenido de gliadina en los alimentos ha motivado al desarrollo de diversos métodos para su detección y cuantificación; sin embargo, una característica común que presentan éstos consiste en su elevado costo, asociado a la adquisición de anticuerpos de la gliadina. Los biosensores de este tipo, se fundamentan en la reacción específica establecida entre antígeno-anticuerpo para lograr altas sensibilidades, bajos límites de detección y garantizar la selectividad del método. Es por ello que pretendemos en este proyecto, desarrollar un sensor para la detección y cuantificación del gluten, que no amerite el uso de biomoléculas.

En un trabajo electroanalítico es de vital importancia la escogencia adecuada del electrodo de trabajo. Una buena alternativa consiste en electrodos modificados con nanopartículas y/o derivados del grafeno. Para el primero, se han reportado altas sensibilidades, así como procesos de respuesta rápido. Por su parte, con el uso de las Nps, se han obtenido mejoras en la sensibilidad y bajos límites de detección, gracias a la gran área superficial específica de éstas, la cual proporciona una zona más amplia para permitir la interacción entre el analito y el electrodo. Por otra parte, la alta reactividad asociada a las nanopartículas puede favorecer la catálisis o la transferencia electrónica en los analitos a detectar. En nuestro caso, resulta de interés el uso de las Nps de $\text{Cu}^{1,2}$ y de $\text{Fe}_x\text{O}_y^{3-5}$.

En base a todo lo expuesto previamente, este proyecto de investigación plantea como objetivo general: *Desarrollar un sensor electroquímico en base a nanopartículas de cobre u óxidos de hierro soportadas sobre un electrodo de óxido de grafeno, y su evaluación como posible detector de gliadina, mediante voltamperometría de onda cuadrada.*

Para alcanzar el objetivo principal del trabajo de investigación descrito se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Extraer gliadina a partir de muestras de harina de trigo.
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas de óxido de hierro en un medio con gliadina como estabilizante.
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas de cobre en un medio con gliadina como estabilizante.
- Obtener y caracterizar al óxido de grafeno por exfoliación de grafito.
- Preparar y caracterizar electrodos de grafito modificados con óxido de grafeno y nanopartículas de óxido de hierro.
- Preparar y caracterizar electrodos de grafito modificados con óxido de grafeno y nanopartículas de cobre.
- Obtener la respuesta y cifras de mérito de los electrodos de grafito modificados en función de la concentración de gliadina, evaluando la disminución de la señal del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ en soluciones acuosas de KCl 1,0 M mediante voltamperometría de onda cuadrada.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. La Enfermedad Celíaca.

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune desencadenada y sostenida por la ingestión de gluten, en individuos genéticamente susceptibles⁶. Como enteropatía autoinmune se entiende a una condición del cuerpo que ocurre cuando el sistema inmunológico ataca la pared intestinal provocando la inflamación crónica de la mucosa del intestino y, por lo tanto, la inadecuada absorción de nutrientes (proteínas, grasas, sales minerales, vitaminas, entre otros)⁷. Dicha enfermedad es causada por la respuesta inmune a los antígenos dietéticos de las proteínas del gluten (contenidas en el trigo, centeno y cebada) y los autoantígenos de la enzima transglutaminasa (TG2)⁶.

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1888, por Samuel Jones Gee. Sin embargo, para ese momento, la causa de la enfermedad era inexplicable, hasta que en 1950 se logró establecer la relación entre la ingesta de trigo con el desencadenamiento de la enfermedad celíaca. Hallazgo que fue realizado por el pediatra de origen holandés Willem Karel Dicke, quien asoció el consumo de pan y cereales a cuadros diarreicos. Posteriormente demostró con sus colaboradores, el pediatra Weijers y el bioquímico Van de Kamer, que la toxicidad que el trigo produce en el organismo, se vincula a su fracción de proteína insoluble en el agua, es decir, al gluten.⁷

La EC tiene una alta prevalencia, alrededor del 1% entre la población mundial,⁶ afectando tanto a niños en edad temprana como a adultos; siendo considerada como la enfermedad intestinal crónica más frecuente, ya que se estima que 1 de cada 100 recién nacidos son capaces de llegar a padecerla⁸. El diagnóstico precoz se hace indispensable, toda vez, por la existencia de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Clínicamente, la enfermedad celíaca (EC) se destaca por presentar una variedad de signos y síntomas que dificultan su diagnóstico temprano. Entre los síntomas se pueden mencionar, de acuerdo al grupo etario al cual pertenece el individuo, los siguientes⁸:

- En Niños: Diarrea, vómitos, dolor abdominal, irritabilidad, apatía.
- En Adolescentes: dolor abdominal, cefalea, menarquía tardía, menstruaciones irregulares, estreñimiento.
- En Adultos: diarrea crónica, dolor abdominal, síndrome de intestino irritable, dolores en huesos y articulaciones, infertilidad, depresión.

Sin embargo, entre los signos compartidos por los grupos, no sólo se encuentra la malnutrición, sino además, la distensión abdominal, la talla baja y la anemia por déficit de hierro.

El tratamiento aplicado, para garantizar una mejor calidad de vida al paciente con dicho trastorno inmunológico, consiste en una dieta que suprima la ingesta de gluten, lo cual conduce a la desaparición de los síntomas señalados con anterioridad y a prevenir las complicaciones. Ello significa que se debe excluir a los cereales anteriormente

mencionados y al pan en todas sus presentaciones, así como tortas, galletas, fideos, espagueti, helados, malta, embutidos, caramelos, enlatados, entre otros.⁹

1.2. El Gluten.

El gluten es una proteína vegetal de bajo valor nutritivo, pese a ello, su uso se extendió por las propiedades extensibles y elásticas que le confiere a la masa del pan. El aumento del consumo de gluten está estrechamente relacionado con la revolución industrial. En el siglo XIX, surge el primer molino a vapor lo que trajo consigo la evolución de los sistemas de panificación, y con ello, la incorporación de técnicas mecánicas para amasar el pan. De esta manera, el aumento de la producción y el consumo masivo del producto, conllevó al auge de la industria panificadora y entonces, el gluten fue incorporado en el proceso industrial a gran escala con el fin de mejorar la calidad del pan.¹⁰

El Codex Alimentarius actualmente define al gluten como la fracción de proteína del trigo, cebada o centeno, que es insoluble en agua o en soluciones de 0,5 M de NaCl.¹¹ El gluten del trigo está compuesto por dos grupos de proteínas que representan el 80-85% del contenido proteico del trigo: gliadinas y gluteninas (Ambas son ricas en los aminoácidos: prolina y glutamina).¹² La gliadina es la fracción soluble en alcohol del gluten, que puede ser extraída mediante una solución que contenga entre 40% a 70% de etanol. Por su parte, las gluteninas son la fracción insoluble en disoluciones etanol-agua; pero solubles en ácidos diluidos.

Las gliadinas están conformadas por grupos de proteínas monoméricas que tienen un peso molecular promedio de 40 kDa (Dalton); además, son de cadena simple y extremadamente pegajosas cuando se hidratan; muestran poca resistencia a la extensión y parecen ser las responsables de la cohesión de la masa. Se clasifican en α -

β -, γ -, $\omega_{1,2}$ -, ω_5 -gliadinas, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, el peso molecular (PW) y a la movilidad que presentan en la electroforesis a pH bajos.^{11,13} Por su parte, las gluteninas consisten en una mezcla heterogénea de polímeros con pesos moleculares desde aproximadamente 500.000 hasta varios millones de Dalton. Sin embargo, ante la reducción de los enlaces disulfuro que están presentes en su estructura (por ejemplo, a través de técnicas como la electroforesis PAGE-SDS), las gluteninas se dividen en subunidades de alto peso molecular (HMW), dentro de las cuales destacan los tipos *x-HMW* y *y-HMW*, que abarcan el rango de 67 – 88 kDa; y de bajo peso molecular (LMW), con masas molares de 32 a 35 kDa¹³

Tabla 1. Composición de los distintos tipos de proteínas que constituyen al gluten.¹³

Tipo	MW (kDa)	Proporción (%) *	Composición Parcial de Aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω_5 -Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1	1
$\omega_{1,2}$ -Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1	1
α -/ β -Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	1
γ -Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3
<i>x-HMW</i> -Gluteninas	83-88	4-9	3	13	0	6	19
<i>y-HMW</i> -Gluteninas	87-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW -Gluteninas	32-39	19-25	38	13	4	1	3

*Medida respecto a la cantidad total de las proteínas del gluten

En la tabla anterior se indica la cantidad porcentual de los aminoácidos mayoritarios que constituyen a cada una de las proteínas del gluten. Las ω -gliadinas son las que presentan mayor cantidad de glutamina, prolina y fenilalanina; por su parte, las α/β - y γ -gliadinas (que son las principales constituyentes de la gliadina) tienen

proporciones de glutamina y prolina muy menores que las ω -gliadinas. Estos dos tipos de gliadinas presentan los dominios N- y C-terminal diferentes: El dominio N-terminal (extremo de la proteína que termina en un grupo amino terminal) consiste principalmente en secuencias repetitivas ricas en glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina y es único para cada tipo de gliadina; en tanto que el dominio C-terminal (extremo de la proteína que finaliza en un grupo carboxilato) resulta ser homólogo para los tipos α / β - y γ -gliadinas.¹⁴

Si bien, la tabla no indica la cantidad de cisteína del gluten, ésta es importante para que las distintas proteínas del gluten establezcan interacciones intramoleculares mediante enlaces disulfuro. A continuación, se muestra una figura que representa de manera esquemática la estructura del gluten; donde las subunidades de glutenina HWM se ligan a través de los ligandos disulfuro intermoleculares formando un esqueleto que forma la base para las ramificaciones de subunidades de glutenida LMW. Las gliadinas pueden interactuar con los polímeros de glutenina por enlaces del tipo SS o interacciones no covalentes como fuerzas de Van der Waals, interacciones por puente de hidrógeno, entre otras.¹⁴

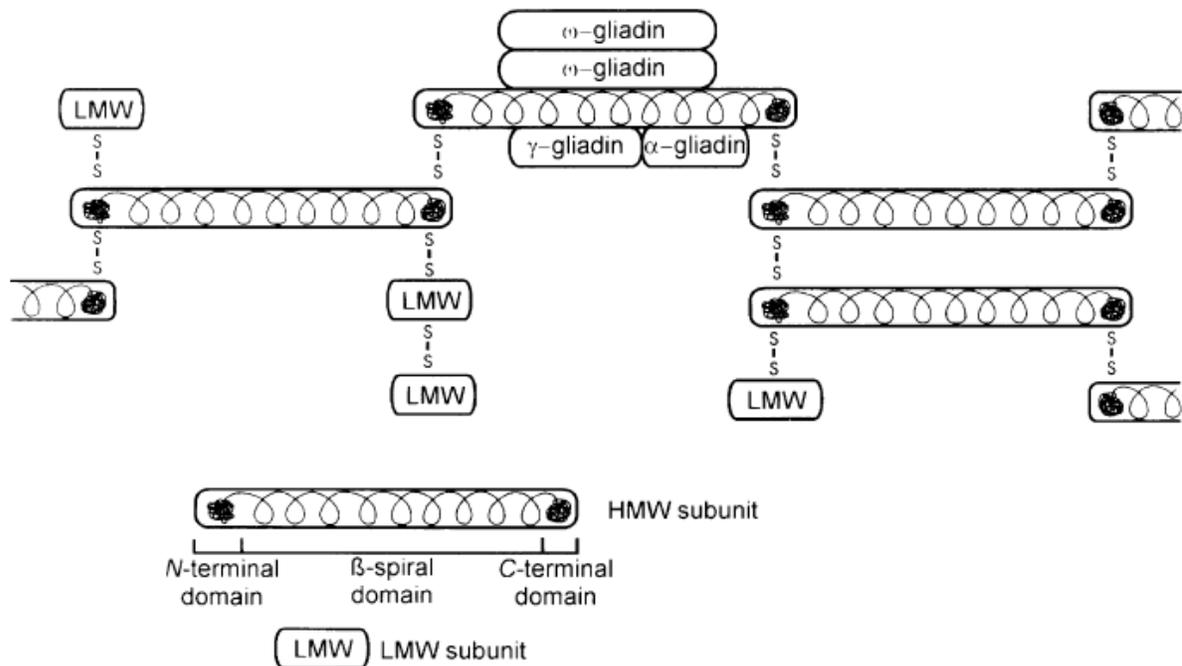


Figura 1. Modelo estructural para el gluten del trigo, en el cual las subunidades HMW constituyen la cadena principal que interactúa con otras proteínas del gluten mediante enlaces disulfuro (subunidades LMW) e interacciones no covalentes (gliadinas).¹⁵

Por último, en lo que respecta la relación entre el gluten y la EC, se puede decir que la toxicidad de las α-gliadinas ha sido demostrada tanto in vitro como in vivo; en tanto que la toxicidad del resto de las fracciones de gliadinas (β-, γ-, ω-) ha sido sugerida en numerosos estudios similares⁶. Ahora bien, debido al carácter tóxico de la gliadina para los celíacos, se han desarrollado distintas técnicas de detección de esta proteína, las cuales se reseñan en la siguiente sección.

1.3. ANTECEDENTES.

En la literatura se encuentran distintas metodologías analíticas que permiten la detección y cuantificación de gluten, las que presentan mayor sensibilidad involucran alguna técnica de separación de proteínas, acoplada generalmente a un espectrómetro de masas; por ejemplo, el método MALDI-TOF-MS^{16,17,18} (en el cual se aplica desorción/ionización láser asistida por matriz -MALDI, por sus siglas en inglés- como técnica de ionización suave, con un analizador de tiempo de vuelo -TOF-; y la detección se realiza a través de la espectroscopía de masas -MS-) o métodos HPLC en fase inversa o por exclusión de tamaños.^{16,19-21} Ahora bien, estas metodologías, suelen estar orientadas sólo a la cuantificación (y por ende detección) de determinados péptidos del gluten, sobre todo, aquellos fragmentos tóxicos de la gliadina.^{16,19-21}

Sin embargo, aun cuando estos métodos son sensibles y selectivos, son poco prácticos debido a sus altos costos de equipamiento y extensos tiempos de análisis. En la actualidad, hay un creciente interés en desarrollar nuevas vías de detección del gluten que presenten sensibilidades y selectividades elevadas, bajo costo y cortos tiempos de análisis. Una alternativa es el desarrollo de biosensores, los cuales pueden ser fácilmente comercializados en forma de kits, permitiendo una cuantificación rápida del gluten. Los sensores suelen construirse usando anticuerpos como componente de reconocimiento de proteínas porque la interacción entre un anticuerpo y un antígeno es una reacción muy específica²².

Dentro de esta categoría, destaca el método propuesto por el grupo *del Dr. Méndez (CNB-CSIC, Madrid, 2003)*²², el cual está basado en un ensayo ELISA tipo Sandwich que se vale del anticuerpo R₅, para reconocer un fragmento de 5 aminoácidos ampliamente repetido en el gluten. El método posee una sensibilidad de 3 ppm, lo que lo hace apropiado para el análisis de gluten en el intervalo de baja

concentración: 20-200 ppm. Además, puede ser utilizado para detectar el gluten, no sólo del trigo, sino de otros cereales como centeno y cebada. Este método ha sido designado por el comité del Codex Alimentarius sobre métodos de análisis y toma de muestras, como método oficial en la detección de gluten en alimentos.²²

En la *Figura 2* se presenta un esquema del funcionamiento de este tipo de ensayos: El anticuerpo (en azul) se encuentra adherido al fondo del tubo de reacción. Cuando se añade la muestra, las moléculas de gluten (en negro) se unen al anticuerpo. A continuación, se añade un nuevo anticuerpo unido a una enzima y al añadir el reactivo final, la enzima cataliza la reacción de formación de un producto coloreado en la mezcla. La cuantificación del producto se puede lograr mediante la medida de la luz absorbida por ese compuesto (espectrofotometría).²²

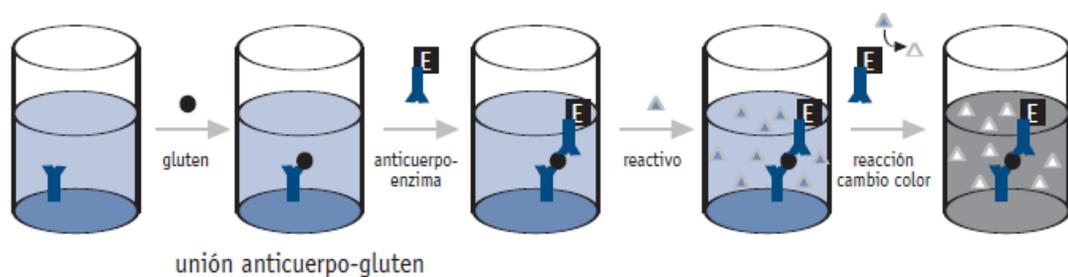


Figura 2. Ensayo inmunoenzimático ELISA tipo sandwich.²²

Sin embargo, en la aplicación de este método pueden producirse falsos negativos cuando se desnaturalizan las proteínas por cambios de presión, temperatura o concentración de sales.²²

Por otra parte, las ventajas que suponen el uso de las técnicas electroquímicas (ver sección 1.4.2.) ha hecho posible la construcción de sensores basado en estos

principios. En tal sentido, en la literatura se encuentran numerosos reportes de sensores electroquímicos para la detección de gluten^{16,22-25} sin embargo la mayoría son desarrollados basados en un patrón: un electrodo de algún material adecuado para el anclaje de una molécula que permita la captura e inmovilización de los anticuerpos en la superficie del electrodo. Luego, este sistema, en un medio que contiene gliadina (o gluten) disuelta en el solvente adecuado, es sometida a la acción de alguna técnica electroquímica; para, a través de la señal obtenida, poder detectar y cuantificar la cantidad de la proteína presente. Por lo que, generalmente, la diferencia entre trabajos está asociada al tipo de electrodo usado y a la molécula de anclaje del anticuerpo. De esta manera, se mantiene en común un elemento: la presencia del anticuerpo (antigliadina), como vía para lograr la selectividad del detector, ya que éste reacciona de forma muy específica con la gliadina, aun dentro de la compleja matriz de la muestra disuelta. En este sentido, mostramos algunos trabajos que ilustran lo mencionado.²² Como ejemplo, se pueden citar los siguientes casos:

*Nassef, H. M. et al. (2008)*²³ desarrollaron un inmunosensor electroquímico de gliadina basado en el autoensamblaje de los fragmentos de la antigliadina sobre electrodos de oro. En el proyecto, utilizaron los ditioles: ácido tióctico y ácido heptaoxadocosanoico para lograr el anclaje de los anticuerpos al electrodo, luego, valiéndose de voltametría de pulso diferencial, obtuvieron como límites de detección, 5,5 y 11,6 ng/mL, respectivamente. Sin embargo, la monocapa autoensamblada de ácido tióctico tardó más de 100 horas para generar una superficie estable y se desestabilizó después de la inmovilización del anticuerpo que fue sometido a captura; mientras que la superficie del ácido heptaoxadocosanoico se formó rápidamente (en menos de 3 h) y se mantuvo estable sólo por 5 días, almacenado a temperatura ambiente.

Generalmente, los detectores de gluten utilizan superficies metálicas de oro sobre las cuales se adhieren moléculas que posean un grupo sulfurado (generalmente un grupo tiol)^{23,26}; luego, estas moléculas son usadas como “ancla” para mantener a la biomolécula inmovilizada en la superficie del electrodo. La razón de esto, es que el proceso de quimisorción entre el oro y el azufre es de aproximadamente 30 Kcal/mol, lo que permite conseguir películas resistentes y estables termodinámicamente.²⁶

*Chiriaco, M. S. et al. (2015)*²⁴ propusieron una plataforma de laboratorio en chip (lab on chip plataform), donde los inmunochips portátiles de gliadina estuvieron basados en un método de transducción que usa la espectroscopía de impedancia electroquímica. Ellos alcanzaron un límite de cuantificación de 0,5 ppm para la gliadina, utilizando anticuerpos (anti-gliadina) anclados sobre electrodos de oro, como medio para lograr la selectividad en el detector.

En otros reportes se encuentra el diseño de sensores en los cuales no utilizan la antigliadina, sino alguna vía biológica alternativa para lograr la detección del gluten; por ejemplo, a partir del uso de aptámeros, o del reconocimiento de alguna secuencia del ADN de la gliadina de la muestra de trigo o cereal utilizada.²⁶⁻²⁸ Estas alternativas, poseen algunas ventajas respecto al uso de anticuerpos; pues no requieren inmunizar animales o conjuntos celulares para la obtención del anticuerpo. De hecho, el uso de aptámeros (que son oligonucleótidos de ADN y ARN de cadena sencilla, cuya longitud es inferior a 100 nucleótidos, y que adoptan una estructura tridimensional capaz de reconocer a una amplia gama de moléculas objetivo), presenta una elevada selectividad²⁶ ya que son capaces de diferenciar homólogos estrechamente relacionados e incluso enantiómeros. A continuación, se exponen algunos trabajos relacionados en el área:

En la tesis doctoral de *Martín, B. (2016)*²⁷ desarrollaron un detector con una respuesta lineal para la concentración de gliadina hasta de 50 nM, con un límite de detección de 0,3 nM y una reproducibilidad del 3,5%; para lo cual aplican métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) a tiempo real, empleando sondas de hidrólisis especialmente diseñadas para la detección y amplificación de las secuencias de ADN específicas que codifican Tri a 18 y Tri a 25.

*González, S. (2015)*²⁶ en su tesis de maestría, estudió la interacción entre el aptámero Gli1 y el péptido 33-mer que forma parte de la α -gliadina, como base para el desarrollo de un aptosensor electroquímico que permita llevar a cabo la determinación de la fracción inmunotóxica del gluten. La inmovilización del aptámero la logró a partir de la unión de su grupo tiol terminal con la superficie de un electrodo de oro. El ensayo finalmente permitió la detección de 30 nM de péptido.

*Mustorp, S. et al. (2011)*²⁸ usaron la reacción de PCR para detectar alérgenos en la comida, incluyendo el gluten. Ellos amplifican la señal valiéndose del método MDLA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Luego, dependiendo del alérgeno estudiado, consiguieron límites de detección entre los 5 a 400 copias de genes.

La síntesis de los aptámeros puede ser igualmente costosa, e implicar un proceso largo para su preparación. Los aptámeros, generalmente, se obtienen *in vitro* a través de un proceso denominado SELEX (Systematic Evolution Ligands by Exponential enrichment), en la que se repiten (entre 6 a 20 veces) un ciclo de 5 etapas sucesivas: incubación, separación, elución, amplificación y acondicionamiento (mediante PCR)²⁶. Por otra parte, los métodos basados en la detección de ADN son métodos indirectos que necesitan establecer una relación entre el ADN presente y la cantidad de proteína que hay en la muestra. Por lo que se presenta el problema de que la relación entre el

gluten y el ADN será variable, pues ésta depende de la especie y variedad del trigo que se estudie²⁶.

Ahora bien, la mayoría de los aminoácidos no son electroquímicamente activos dentro de un rango de potencial útil, con la excepción del triptófano, la tirosina y la cisteína.²⁹ Puesto que el gluten posee proporciones pequeñas de estas proteínas en su composición, no suelen utilizarse métodos electroquímicos que midan directamente la señal de esta proteína; sin embargo, en 2015, *Eksin, E. et al.*³⁰, publicaron un trabajo en el cual desarrollaron un detector de gluten sin valerse de alguna modificación avanzada de la superficie del electrodo, esto es, el uso de biomoléculas costosas como: anticuerpos, ADN o aptámeros. En este sentido, el ensayo consistió en la aplicación de voltamperometría de pulso diferencial en un sistema electroquímico compuesto por un electrodo de grafito como electrodo de trabajo, el cual estaba sumergido en soluciones de gluten en DMSO (las soluciones más diluidas fueron preparadas usando ABS, esto es, una solución buffer de acetato al 0,50 M que contiene NaCl al 20 mM, con un pH=4,80). Estas soluciones, preparadas a partir de una muestra pura de gluten certificada por Sigma-Aldrich, fueron utilizadas en el desarrollo de una curva de calibración (*ver Figura 3*), en la cual obtienen un rango de concentración lineal de gluten entre 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$, y un límite de detección de 7,11 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, mediante este ensayo determinaron que la cantidad de gluten en una muestra de harina comercial (que reportaba una concentración de 60,00 $\mu\text{g/mL}$) era de 62,00 $\mu\text{g/mL}$. La metodología seguida por los autores provee una forma rápida, barata, directa y sensible de determinar el gluten. De hecho, el uso de electrodos de grafitos desechables resulta más práctico en comparación con los métodos inmunoquímicos (que se valen de anticuerpos) o cualquier otra metodología enfocada en el desarrollo de sensores bioquímicos.

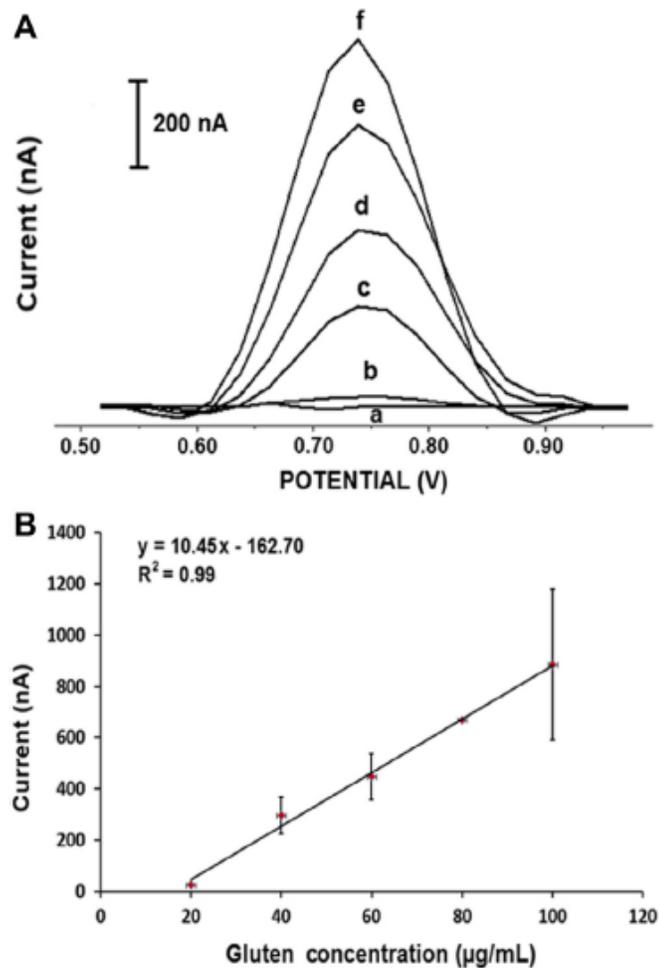


Figura 3. (A) Voltamperograma de pulso diferencial que muestra la señal de (a) DMSO-ABS en ausencia de gluten, (b) 20 $\mu\text{g/mL}$ de gluten, (c) 40 $\mu\text{g/mL}$ de gluten, (d) 60 $\mu\text{g/mL}$ de gluten, (e) 80 $\mu\text{g/mL}$ de gluten, y (f) 100 $\mu\text{g/mL}$ de gluten. **(B)** Curva de calibración que representa los cambios de la señal de oxidación del gluten, en presencia de distintos niveles de concentraciones de gluten en el rango de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$.³⁰

Ahora bien, en este proyecto se pretende desarrollar una metodología, no basada en el uso de anticuerpos ni aptámeros, para la construcción de un sensor electroquímico de gliadina. Por tal razón, es de vital importancia la escogencia

adecuada del electrodo de trabajo. Considerando lo reportado por Eksin, E. et al.³⁰ los electrodos en base a carbono parecieran ser una buena alternativa para la construcción de sensores de gliadina. Sin embargo, sería interesante utilizar como alternativa electrodos de grafeno soportado sobre grafito, o variaciones de estos, ya que se han reportado para este material (grafeno) altas sensibilidades, así como procesos de respuesta rápido.³¹⁻³³

De hecho, el grafeno desde su descubrimiento en 2004³⁴ ha sido ampliamente utilizado debido a sus propiedades fisicoquímicas notables. Éste consiste en una lámina plana del espesor de un átomo, cuya estructura está compuesta por átomos de carbono sp^2 unidos entre sí formando un enrejado de estructuras hexagonales (ver *Figura 4*). Posee una alta superficie específica (que teóricamente se calcula en $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ para una sola capa de grafeno), alta capacidad de transporte de electrones y una excelente conductividad térmica y eléctrica; lo cual lo hace útil en el campo de la electroquímica^{34,35}. Así, la alta superficie de las hojas de grafeno eléctricamente conductoras da lugar a altas densidades de moléculas de analito unidas, lo cual produce una alta sensibilidad. Por su parte, gracias a la transferencia de electrones entre grafeno y especies redox, se pueden aplicar métodos de detección basados en el fenómeno de transferencia de electrones³⁵.

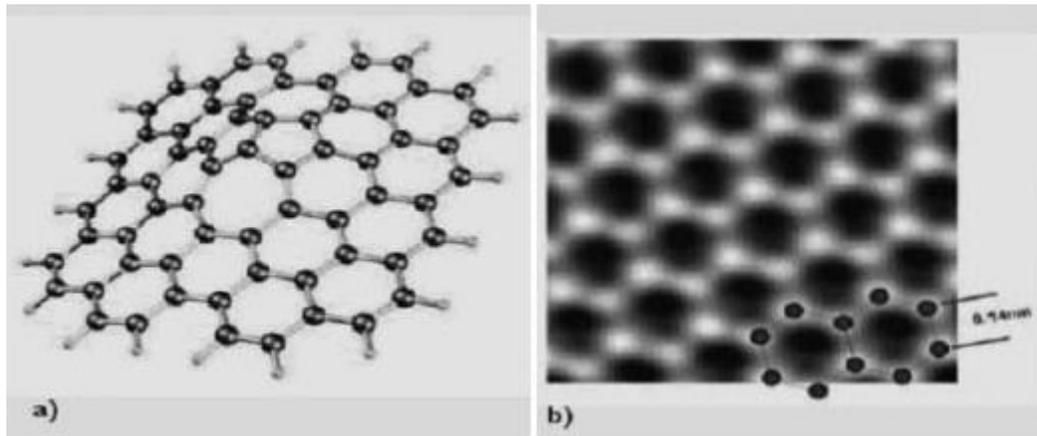


Figura 4. (a) Simulación de capas de Grafeno (b) Micrografía de Grafeno obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión³⁶

Además los materiales porosos de carbono han sido propuestos como electrodos excelentes para el desarrollo de inmunosensores³⁵⁻³⁷. La ventaja electroquímica de estos, se basa en que la porosidad incrementa el área superficial del electrodo, permitiendo la inmovilización de una gran cantidad de ligandos, y por ende se mejora la sensibilidad del detector. Además, promueve la difusión del analito a través de los poros interconectados del electrodo, permitiendo que la detección sea rápida^{35,36}.

Los materiales porosos provenientes del grafeno tienen muchas otras ventajas comparadas con otras estructuras porosas de carbono, como lo son una alta resistencia mecánica (lo que ayuda a prevenir el colapso de las estructuras porosas), alta estabilidad química y propiedades electroquímicas ideales para el desarrollo de sensores. En este sentido, los óxidos de grafeno reducidos poroso (prGO) poseen todas las ventajas de las nanoláminas de óxidos de grafeno reducidos (rGO) para la detección electroquímica, pero con un área activa incrementada y una mayor facilidad para el transporte de masa.^{35,36}

En los siguientes trabajos podemos ver la utilidad de los óxidos de grafeno en la elaboración de diversos sensores:

*Han Tae et al.(2011)*³² diseñaron una ruta de decapado lenta y controlable para producir láminas de óxido de grafeno reducidas nanoporosas por vaporización hidrotérmica a 200°C. En contraste con el óxido de grafeno reducido no poroso recocido a la misma temperatura, el óxido de grafeno nanoporoso recocido al vapor mostró un aumento de casi 2 órdenes de magnitud en la sensibilidad cuando se utilizó como sensor para la detección de NO₂.

*Li, G. et al.(2014)*³³ sintetizaron por vía hidrotérmica un electrodo de óxido de grafeno reducido (rGO) al que se le anclaron nanopartículas de Ni_{0,69}Co_{0,64}S₂, y que fue usado para el desarrollo de un sensor de glucosa no enzimático de alto rendimiento. A través de microscopía electrónica de transmisión determinaron que el electrodo consistía en una estructura porosa conformada por nanoláminas interconectadas, entre las cuales se encontraban ancladas las Nps. Por su parte, los voltamperogramas cíclicos (*Figura 3*) mostraron una actividad electroquímica excelente, para bajos potenciales aplicados, en lo que se refiere a la oxidación de la glucosa (en muestras de suero humano), puesto que obtuvieron un límite de detección de 0,078 µM y un amplio rango lineal de 0,001-5 mM y 5-16 mM,

Los buenos resultados en cuanto a la selectividad del detector se debieron a que la estructura porosa del grafeno favorece la oxidación de la glucosa sobre la oxidación de las interferencias (fructuosa, lactosa, ácido úrico y ácido ascórbico) que se encuentran en las muestras de suero humano que utilizaron. Esto debido a la rápida velocidad de difusión de la glucosa; así como la baja actividad electroquímica de las interferencias para los valores de potenciales estudiados³³

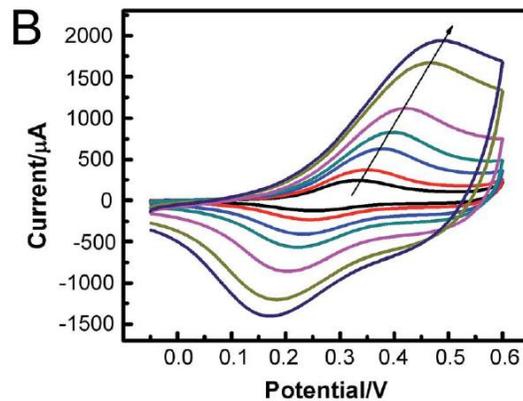


Figura 5. Voltametría cíclica del electrodo de Ni_{0,69}Co_{0,64}S₂/rGO en una solución de 0,3 M de NaOH con 1mM de glucosa, a varias velocidades de escaneo (desde la curva interna a la más externa): 5, 10, 20, 30, 50, 80 y 100 mV.s⁻¹.³³

En lo que respecta, a la detección de gliadina, recientemente se tiene que: *Chekin, F. et al.*³⁷, en octubre de 2016, publican los resultados de un artículo cuyo desarrollo experimental sigue en proceso: Ellos construyen un sensor de gliadina, utilizando un electrodo poroso de óxido de grafeno reducido (prGO, por sus siglas en inglés), al cual enlazan los anticuerpos de la gliadina gracias al ácido 1-pirenocarboxílico, quien actúa como molécula de anclaje (*Figura 6*). Luego, usan voltametría de pulso diferencial en un medio con una solución de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} en 0,1 M de PBS, para obtener así la señal electroquímica de la gliadina. De esta manera, construyen un sensor con un límite de detección de (1,2±0,5) ng.L⁻¹ con alta selectividad y sensibilidad a la gliadina. Además, la funcionalidad del detector es puesta a prueba, al comparar los resultados del análisis de muestras de comida, usando el detector desarrollado, y el kit comercial ELISA.

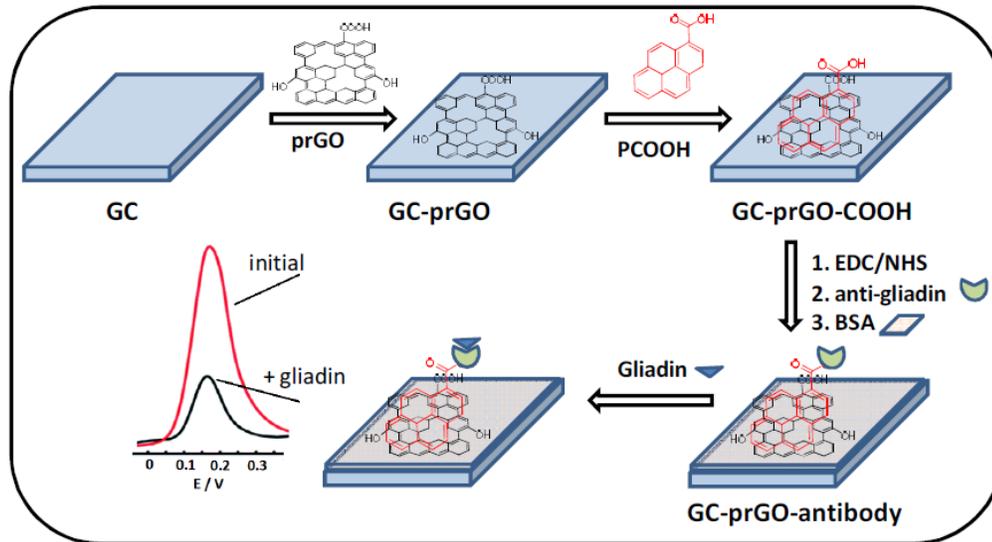


Figura 6. Esquema de construcción del inmutensur electroquímico de gliadina propuesto por Shekin, F. et al.³⁷

Una vez más, los autores se aprovechan del hecho de que la porosidad del electrodo de prGO le confiere a éste un aumento de su área superficial, lo que a su vez, permite la inmovilización de una mayor cantidad de ligandos en su superficie; lo que favorece al incremento en la sensibilidad del detector.

Sin embargo, el interés por la elección de materiales que favorezcan al desarrollo de sensores con características de alta selectividad y sensibilidad, así como bajos límites de detección, no está enfocado exclusivamente al grafeno y sus derivados; pues también destacan números sensores que incorporan a las nanopartículas para este propósito³⁸. Las nanopartículas se definen como agregados aislados de átomos de un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm, rodeados de una cápsula protectora o estabilizadora que evita su aglomeración. Además se caracterizan por poseer propiedades físicas y químicas que difieren considerablemente del metal sólido (*bulk*) del cual se forman³⁹. En este sentido, destaca el hecho de que poseen grandes áreas superficiales, lo que permite el desarrollo de sensores con alta sensibilidad y bajos límites de detección, puesto que el analito dispone de una zona más amplia para

interactuar con el electrodo. Por otra parte, la alta reactividad asociada a las nanopartículas puede favorecer la catálisis o la transferencia electrónica en los analitos a detectar.³⁸ Por estos factores, se han realizado numerosos estudios de sensores, ya sean electroquímicos o no, que utilizan como herramientas a las nanopartículas; en particular, cabe destacar los progresos relativos a la detección de glucosa por una vía no enzimática, producto del uso de nanopartículas de óxido de cobre. Un ejemplo particular, lo constituye el sensor electroquímico de Luo, J. et al. (2012)⁴⁰; para lo cual utilizan un electrodo preparado a partir de deposición electroquímica de Cu-Nps en láminas de grafeno. Así lograron un límite de detección de 0,5 μM y una rápida respuesta amperométrica por parte de la glucosa (<2s). Adicionalmente, el electrodo mostró una alta selectividad a la glucosa, con bajos niveles de interferencias por otros químicos como: ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico, carbohidratos e iones cloruro. Esto representa un avance en la detección de glucosa (vía no enzimática), pues generalmente existe dificultad para medir su señal por la interferencia de sustancias orgánicas (sobre todo ácido ascórbico y ácido úrico) que suelen estar presentes en la matriz de las muestras.⁴¹ Por lo tanto, en este trabajo se pone de relieve, la utilidad de los detectores de grafeno modificados con Nps como medio para lograr la selectividad del sensor.

Por su parte, en el campo de la gliadina, también se han desarrollado sensores con nanopartículas^{42,43}. Como ejemplo, se reportan los resultados de Chu, P.T et. Al. (2012)⁴³, los cuales desarrollaron un inmunosensor de gliadina que se basa en los cambios en la frecuencia de un chip de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés). Para garantizar la selectividad del sensor, inmovilizaron a la superficie del electrodo, anticuerpos de la gliadina obtenidos en pollos (IgY), mediante glutraldehído. Sin embargo, también llevaron a cabo una modificación en la preparación del sensor: incorporando nanopartículas de Au de 25 nm a la superficie del electrodo, justo antes de la inmovilización de los anticuerpos. Después, ambos

sensores fueron puestos a prueba (*Figura 7*): El sensor modificado con Nps Au presentó una mayor sensibilidad (dada por la pendiente de la curva de calibración); así como un menor límite de detección (LOD), de tan solo 8 ppb, respecto al LOD del otro sensor, que resultó de 22 ppb. Por otra parte, el coeficiente de correlación de ambas curvas indica que los datos medidos por el electrodo modificado con Nps se ajustan mejor a la regresión lineal.

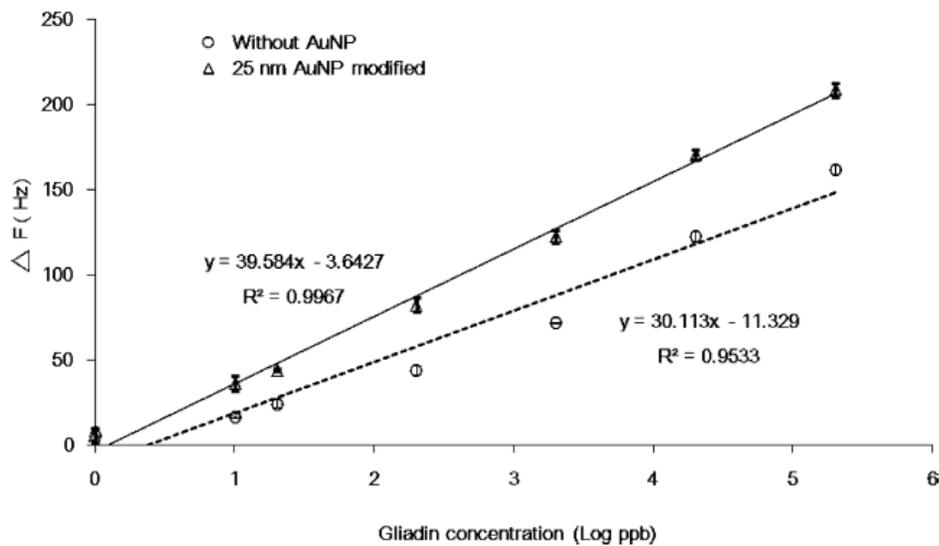


Figura 7. Curvas de calibrado del análisis de gliadina en 60% de etanol con el sensor de QCM. Las líneas sólidas representan la curva de calibrado del sensor de QCM con el chip modificado con nanopartículas de Au; por su parte, la línea de regresión cuyo trazo es espunteado fue obtenida para el caso en que el chip estaba libre de Nps.⁴³

1.4. FUNDAMENTOS ELECTROQUÍMICOS.

1.4.1. Electroanálisis.

La electroquímica analítica puede definirse como el estudio de todos los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor–disolución (generados

espontáneamente o por medio de una perturbación externa del tipo eléctrico) con el objetivo de resolver un problema de tipo químico. Ahora bien, de acuerdo al tipo de perturbación que se imponga será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá entonces el tipo de información que se obtendrá para caracterizar a las moléculas, las reacciones en el electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación. En este sentido, si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor–disolución⁴⁴. Así, tenemos que las técnicas electroquímicas pueden dividirse según la manera en que se realizan las mediciones a partir de la perturbación del sistema, de acuerdo al siguiente diagrama (*Figura 8*):

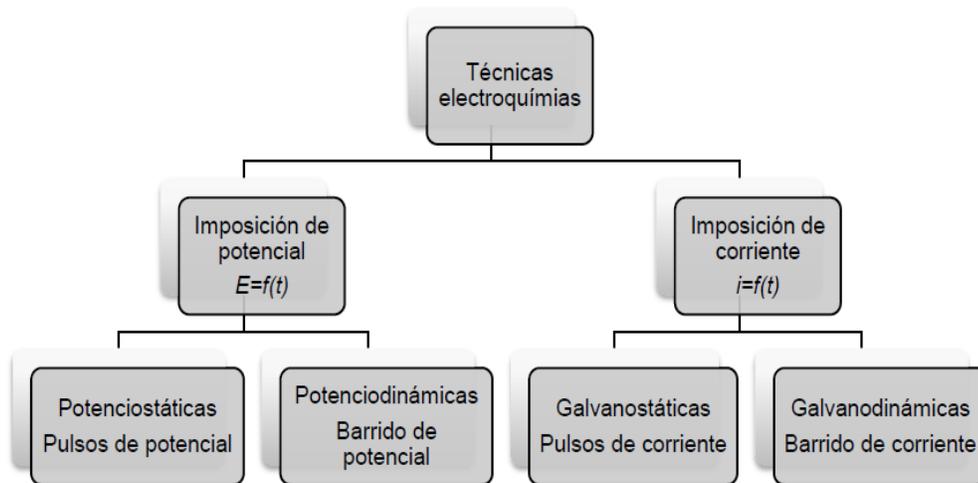


Figura 8. Clasificación de las Técnicas Electroquímicas⁴⁴

Cabe acotar que, en una reacción electroquímica, los parámetros que se registran son la intensidad de corriente y la diferencia de potencial. Sin embargo, cuando se mide la diferencia de potencial no solamente se mide la que se impone entre electrodos mediante un potenciostato (E_i), sino otros aportes relacionados con^{45 46}:

- ✓ El potencial de unión líquida (E_L), que es el que se forma cuando dos fases iónicas separadas en forma semipermeable se ponen en contacto.
- ✓ El potencial iR a causa de la resistencia de todo el circuito, incluyendo los conductores y la disolución.
- ✓ El potencial de un electrodo de referencia (E_{REF}).

De esta manera, el potencial medido E_{med} , viene dado por:

$$E_{med} = (E_i + E_j + iR) + E_{REF} \quad [1]$$

Análogamente, cuando se registra la intensidad de corriente, el valor de ésta lo constituyen diferentes aportes^{45,46}:

- ✓ La corriente capacitiva (i_{cap}), la cual aparece cuando se forma la doble capa eléctrica en la solución.
- ✓ La corriente farádica (i_{far}), que es la corriente asociada a la electrólisis.

De esta manera, la corriente total medida (i_{med}) viene dada por:

$$i_{med} = i_{cap} + i_{farádica} \quad [2]$$

1.4.2. Sensores Electroquímicos.

Un sensor químico es un pequeño dispositivo que puede ser usado para la medición directa de un analito en la matriz de una muestra. Estos dispositivos

transforman la información química en una señal útil que puede ser procesada, y por tanto, facilitan la información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos⁴⁷. Un sensor ideal, debe ser capaz de responder de manera continua y reversible, y no debe perturbar a la muestra⁴⁵.

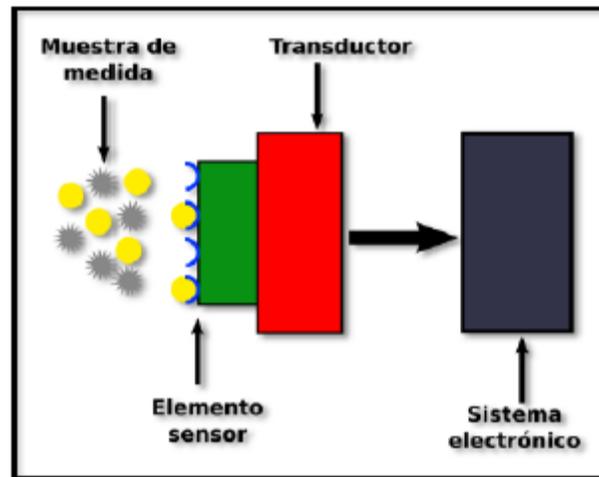


Figura 9. Esquema de un Sensor.

Los sensores electroquímicos representan una importante sub-área de los sensores químicos, en la cual un electrodo es usado como elemento de transducción⁴⁵, por lo que, el cambio químico acontecido en el sistema, es traducido como señales eléctricas. Según la característica de esta señal, se utiliza una técnica electroquímica distinta para obtener la información de la muestra: Conductimetría, Potenciometría, Amperometría, etc.

Como ventajas, los sensores electroquímicos suelen ser dispositivos que se caracterizan por disponer de una fabricación más simple y económica que la del resto de los transductores; además, poseen amplio intervalo de linealidad y tiempo de respuestas muy cortos⁴⁷. Por otra parte, los equipos (potenciostatos, conductímetros,

etc) que permiten recoger y procesar la señal son económicos; y de fácil mantenimiento y manejo⁴⁷.

Ahora bien, cuando el elemento de transducción electroquímico posee una capa biológica, que es la encargada de interactuar con el analito objetivo; entonces, estamos tratando con biosensores electroquímicos⁴⁷. En estos sensores, un agente bioespecífico es inmovilizado o retenido en un electrodo adecuado, convirtiendo así el reconocimiento biológico en una respuesta amperométrica o potenciométrica. Dos categorías de biosensores analíticos pueden distinguirse: Aparatos biocatalíticos (que utilizan enzimas, células, o tejidos como biocomponentes inmovilizados) y sensores de afinidad (basados en anticuerpos, receptores de membrana o ácidos nucleicos)⁴⁵.

Estos últimos, se basan en los enlaces selectivos de biomoléculas (anticuerpos, receptores o polinucleótidos) hacia ciertas especies específicas. Como el proceso de reconocimiento biomolecular está gobernado principalmente por la forma y el tamaño del centro receptor de la biomolécula y el ligando de interés (el analito), entonces existe una alta sensibilidad y selectividad en estas reacciones.⁴⁵

En este tipo de sensores, un paso importante consiste en la inmovilización del material biológico sobre el transductor electroquímico, para dar formas insolubles que retienen la actividad de la biomolécula⁴⁷. Sin embargo, el tiempo de vida y la sensibilidad del sensor dependen en gran medida de la metodología de inmovilización usada, por lo que, si esta no es adecuada, es posible la alteración del material biológico respecto a su estado nativo⁴⁷.

Además de los biosensores, otros electrodos de gran relevancia son los electrodos modificados químicamente. La importancia de éstos reside en el mayor control e influencia que se puede lograr no sólo sobre el potencial aplicado, sino

también en lo que a la reactividad superficial se refiere, pudiendo preseleccionarse o anticiparse la respuesta del electrodo modificado hacia especies externas⁴⁷.

Así, el material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo (e incluso específico) a un analito en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, sobre el electrodo sin modificar. La gama de especies modificadoras es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros². Incluso, pueden usarse nanopartículas para este propósito^{1-4,42,43}.

La capa de modificador debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene el analito, lo cual se asegura normalmente gracias a la presencia de un grupo electroactivo en dicha capa modificadora o, en algunos casos, mediante el empleo de polímeros conductores. La unión de estos centros mediadores de material base del electrodo puede conseguirse de muy diversas formas tanto físicas como químicas⁴⁷.

Cabe acotar que, las principales aplicaciones de los electrodos modificados en el área del Electroanálisis son⁴⁵: (1) preconcentración, (2) electrocatálisis y (3) eliminación de interferencias.

1.5. Técnicas Empleadas

1.5.1. Voltamperometría.

La voltametría comprende un grupo técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable en la solución que se analiza.

Para asegurar la polarización de este electrodo, generalmente sus dimensiones son reducidas. En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. Así, el proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, y comprende no sólo la reacción de la especie electroactiva en el electrodo sino el mecanismo de transferencia de masa. En la mayoría de los casos, la electrólisis se efectúa bajo condiciones tales, que la difusión sea el proceso fundamental en el transporte de la especie electroactiva; ya que la migración y la convección se pueden minimizar por la adición de un exceso de electrolito soporte y evitando el movimiento de agitación.⁴⁸

La voltimetría no sólo es utilizada para el análisis de rutina cuantitativo, pues también constituye una herramienta importante para el estudio de los mecanismos y de las velocidades de los procesos de oxidación/reducción, en particular para sistemas orgánicos y de compuestos organometálicos. De hecho, suele ser común que a partir de la voltimetría se revele la presencia de intermediarios en las reacciones.⁴⁹

Ahora bien, el registro de la respuesta a la perturbación (la corriente), en función del potencial aplicado se denomina voltagrama, voltamograma o voltamperograma. En estos, se puede modificar tanto la velocidad de barrido como el límite superior y/o inferior del mismo; donde, los límites del barrido de potencial varían según el material electródico y el tipo de disolvente utilizado⁴⁵

1.5.2. Voltamperometría Cíclica.

En la voltimetría cíclica, la variación de potencial aplicado a un electrodo colocado en una disolución no agitada está provocada por una señal de forma triangular⁴⁵ tal como se muestra en la *Figura 10*. Observe que el potencial varía

linealmente desde E_0 hasta E_f ; luego, el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 . Este ciclo, suele darse varias veces y los potenciales en los que acontece el cambio en la dirección de barrido se les denominan potenciales de cambio o de inversión. Cabe acotar, que dichos potenciales de inversión suelen escogerse de manera que se lleve a cabo la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más de las especies electroactivas del sistema.⁴⁸

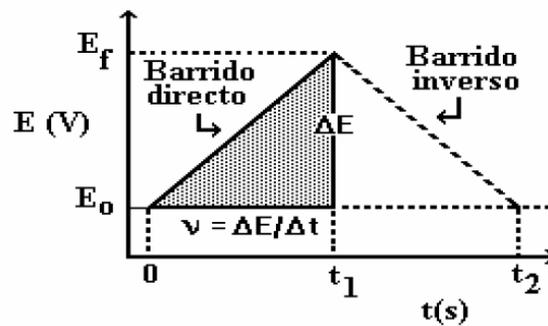


Figura 10. Señal de Excitación en una voltametría cíclica.⁴⁹

La respuesta consecuente a la señal se llama voltamperograma cíclico, y consiste en una gráfica de la corriente i en función del potencial aplicado, como se muestra en la *Figura 11*:

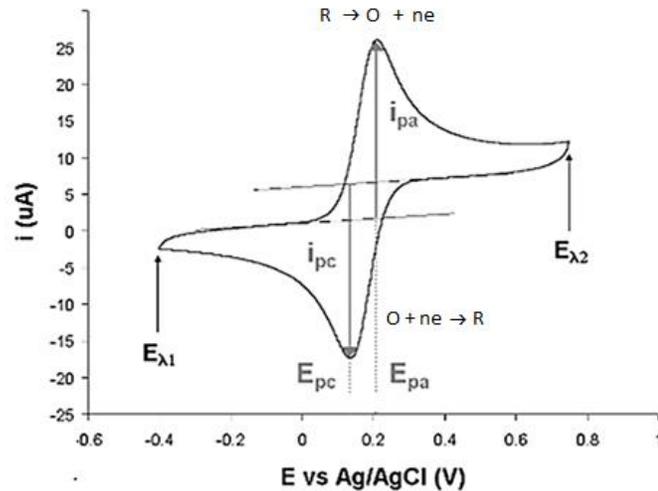


Figura 11. Voltamperograma cíclico para una reacción reversible.⁵⁰

Donde, E_{pa} es el potencial de pico anódico; E_{pc} es el potencial de pico catódico; i_{pa} es la corriente de pico anódica; i_{pc} es la corriente de pico catódica.

La figura anterior muestra la respuesta esperada para una pareja redox reversible durante un único ciclo de potencial aplicado. Se asume que sólo la forma reducida R está presente inicialmente. Así, para el primer mediociclo, se empieza desde un valor donde no ocurre oxidación; luego, a medida que el potencial aplicado se aproxima al potencial E° característico para el proceso redox, una corriente anódica comienza a incrementarse, hasta que alcanza un pico. Después de atravesar la región de potencial en la cual la oxidación tiene lugar (al menos $90/n$ mV más allá del pico), la dirección del barrido de potencial se invierte, y durante el escaneo inverso, las moléculas O (generadas en el primer mediociclo, y acumuladas cerca de la superficie) son reducidas para formar nuevamente a R, resultando en un pico catódico. Los picos característicos en el voltamperograma cíclico son causados debido a la formación de la capa de difusión cerca de la superficie del electrodo.⁴⁵

Por otra parte, para establecer la proporcionalidad entre el perfil de la corriente obtenida del barrido del primer ciclo y la intensidad de corriente, concentración y velocidad del barrido, se aplica la a ecuación de Randles – Sevcik:⁴⁵

$$i_p = (0,4463) \cdot \left(\frac{F^3}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad [3]$$

Donde i_p es la intensidad de corriente de pico; n es el número de electrones transferidos; A es el área superficial del electrodo; D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva; C es la concentración de la especie electroactiva; v es la velocidad de barrido; T es la temperatura; R es la constante de los gases; F es la constante de Faraday. Cuando $T = 25^\circ\text{C}$, la ecuación anterior nos queda como:⁴⁵

$$i_p = (2,69 \times 10^5) \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad [4]$$

La ecuación anterior es válida sólo para sistemas reversibles. En procesos irreversibles, la ecuación de Randles-Sevcik se modifica debido a la corrección de términos cinéticos:⁴⁵

$$i_p = (2,99 \times 10^5) \cdot n(\alpha \cdot n_\alpha)^{\frac{1}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (\text{a } 25^\circ\text{C}) \quad [5]$$

Donde n_α es el número de electrones que se transfieren en el paso determinante, y α es el coeficiente de transferencia.

Por último, es importante acotar que, en esta técnica, ya que se electroliza una especie y se invierte el potencial para comprobar la formación de su par redox, se pueden dilucidar mecanismos de reacción. Por otra parte, al variar la velocidad de

barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos Redox⁴⁵.

1.5.3. Voltamperometría de Onda Cuadrada

La voltamperometría de onda cuadrada (VOC) es una técnica diferencial de gran amplitud en la que se aplica una señal de excitación compuesta por una onda cuadrada simétrica que está superpuesta a un potencial de escalera base (ver *Figura 12*)⁴⁵. Los parámetros que conforman a la señal son: la amplitud de modulación del impulso (E_{sw}); el paso de potencial entre cada ciclo (ΔE), y el período de la onda cuadrada (τ).

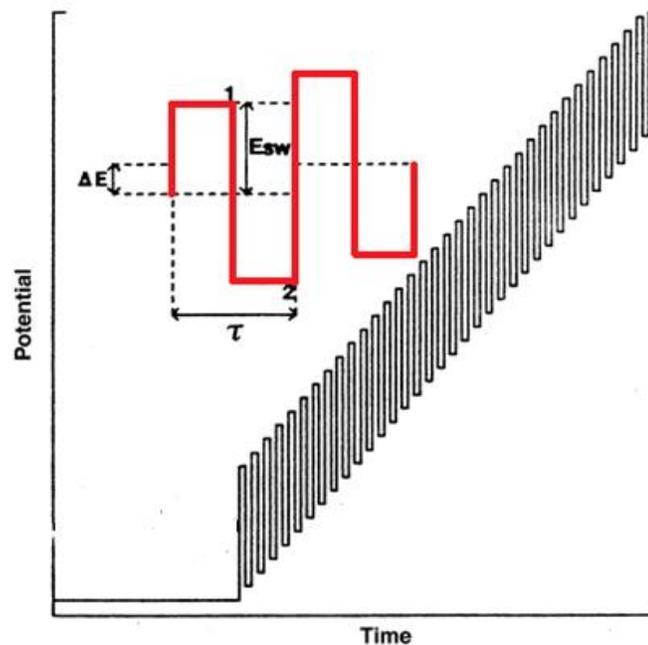


Figura 12. Ejemplo de la señal de excitación aplicada en una voltamperometría de pulso diferencial.⁴⁵

La corriente se muestrea dos veces: justo al final de la aplicación del *pulso directo* (ver el punto 1 en la *Figura 12*), y después de la culminación del *pulso inverso* (ver punto 2). La primera corriente es sustraída instrumentalmente de la segunda, y esta diferencia $[\Delta i = i(t_2) - i(t_1)]$ es graficada respecto al potencial aplicado, obteniendo así la el voltamperograma correspondiente (ver *Figura 13*), el cual consiste en un pico de corriente (i_p) simétrico respecto al potencial de media onda y directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva del sistema:

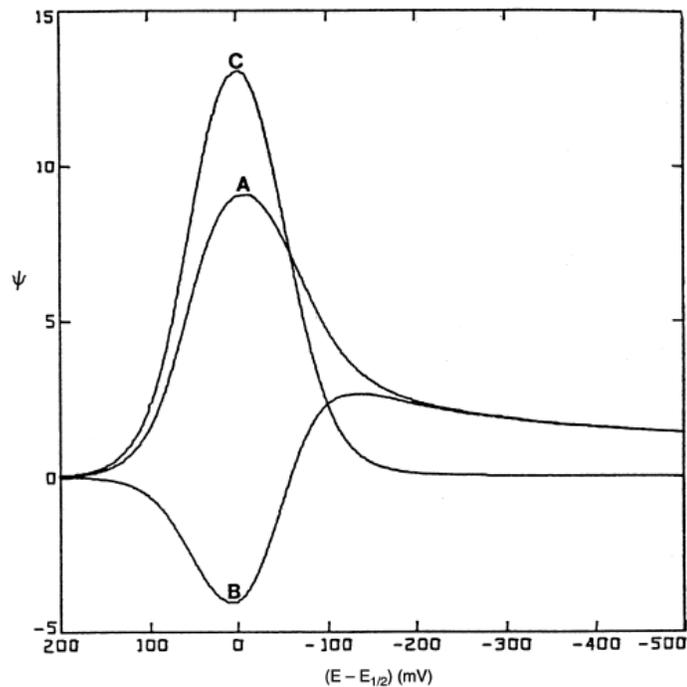


Figura 13. Voltamperograma de onda cuadrada para una reacción reversible de transferencia electrónica. Las curvas A y B representan a las corrientes *directa* e *inversa*, respectivamente; la curva C viene a ser la corriente neta dada por la diferencia Δi de las corrientes anteriores⁴⁵

La SWV, en relación con la voltamperometría de pulso diferencial (DPV), es más rápida y presenta una sensibilidad de 3,3 a 4 veces mayor⁴⁵, ya que la intensidad de

corriente global resulta en la suma de dos corrientes: anódica (fase positiva del impulso, oxidación) y catódica (fase negativa del impulso, reducción). Por su parte, los límites de detección de la SWV son alrededor de dos a tres veces más bajos que los de la DPV, esto es del orden de los 10^{-8} M⁴⁵, siempre que se realicen las correctas discriminaciones con la corriente de fondo⁴⁶. Cabe acotar, que la técnica SWV resulta extremadamente útil cuando se requiere medir la concentración de especies orgánicas o inorgánicas a niveles trazas.

1.5.4. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE-SDS)

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas en dependencia fundamental de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Aunque también juegan un papel preponderante factores como el peso molecular y la estructura tridimensional de la biomolécula.⁵¹ Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad y con gran poder de resolución; son útiles en la determinación de otros parámetros como el peso molecular, el número de cadenas polipeptídicas y el punto isoeléctrico; y aportan información acerca del criterio de pureza o del comportamiento ácido-base de las moléculas⁵¹

Para la aplicación de la técnica, se dispone de una cámara que contiene un soporte sólido en cuyos extremos se acoplan 2 electrodos conectados a una fuente de poder. Generalmente, la matriz (o soporte) consiste en un gel de poliacrilamida que se genera por la polimerización vinílica del monómero acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), formando un retículo de polímeros semejante a una malla tridimensional.⁵² Luego, el gel es impregnado con una solución tampón (ya que la carga de la biomoléculas depende del pH del medio); y se le añade una cantidad pequeña de la muestra, confinándola a una zona estrecha del soporte. Para la preparación de la muestra de proteína se realiza una reacción química, en la que se rompen enlaces

peptídicos y puentes disulfuro por acción de detergentes iónicos (SDS), reactivos reductores (betamercaptoetanol) o temperaturas elevadas (95°C), que al final sólo buscan desnaturalizar a la proteína hasta su estructura primaria.

Bajo las condiciones descritas anteriormente, se aplica un potencial en los extremos del soporte que genera el movimiento electroforético de las distintas moléculas. Sin embargo, el gel posee poros de diferentes dimensiones moleculares, que delimitan la velocidad de traslado y el volumen de las moléculas durante el proceso electroforético. De esta forma, la separación no sólo se produce por las diferentes cargas de las moléculas sino también por su tamaño.⁵³ Para establecer un adecuado criterio de identificación, se deben realizar corridas con distintos patrones de peso molecular conocidos. Por último, la observación de las distintas bandas electroforéticas es posible debido a la tinción de la muestra, usando el colorante Azul de Coomassie.

1.5.5. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión, con gran aplicación para nanopartículas e incluso macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros⁵⁴. Está basada en la medición de las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la luz dispersada por partículas bajo movimiento Browniano⁵⁵

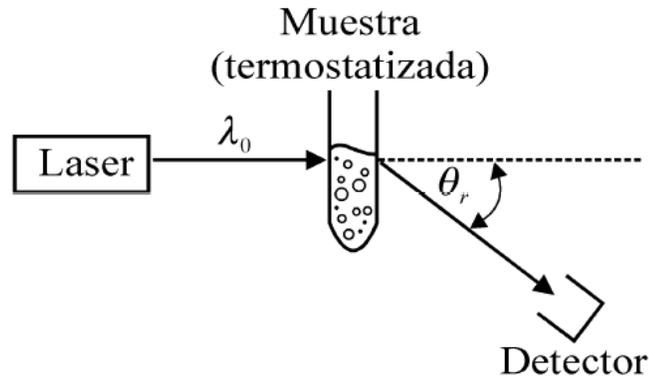


Figura 14. Dispersión Dinámica de Luz producto de la dispersión de radiación incidente λ_0 sobre una muestra.

En la *Figura 14* se esquematiza un experimento típico de DLS, en el cual una muestra es irradiada con un haz de luz láser de longitud de onda λ_0 . La radiación incidente se dispersa en todas las direcciones al interactuar con las partículas en suspensión. Luego, si un detector es colocado a un ángulo de medición θ_r , es posible medir la intensidad de la luz dispersada en esa dirección. Sin embargo, la técnica no tiene en cuenta la dependencia con el ángulo sino que estudia la variación de la intensidad en función del tiempo $I(t)$,⁵⁴ siendo el movimiento Browniano de las partículas en suspensión el causante de las fluctuaciones temporales en la intensidad de la radiación: el cambio de las posiciones relativas de las partículas varía constantemente entre sí, provocando cambios en las condiciones de interferencia y, por ende, en la propia intensidad de dispersión. Por otra parte, el tamaño de partículas puede ser relacionado con la intensidad de la luz dispersada: las partículas pequeñas, al moverse más rápido, generan fluctuaciones de mayor frecuencia en la intensidad $I(t)$, en comparación a las partículas más grandes, que producen variaciones más lentas.⁵⁴

1.5.6. Espectroscopía UV-Visible.

La espectroscopía UV-visible es una técnica fundamentada en la interacción de la materia con la radiación electromagnética (en el rango del espectro comprendido entre 19 y 800 nm).⁵⁶

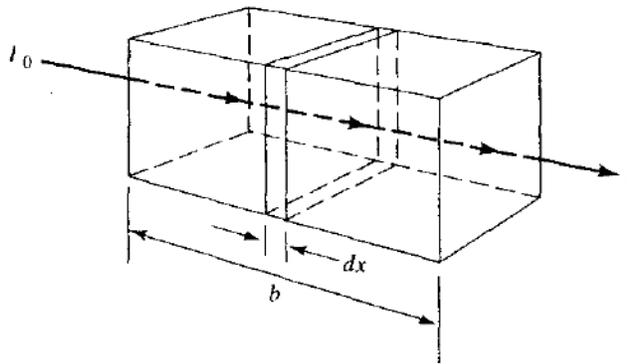


Figura 15. Esquema de la absorción de radiación por parte de una solución de concentración C confinada en una celda de longitud b .⁵⁶

En la Figura 15 se observa a la luz visible o ultravioleta de intensidad I_0 incidir sobre la muestra; este haz es atenuado y, al salir, posee una intensidad I menor; en tanto que, la radiación restante es absorbida por los electrones de valencia, siendo éstos promovidos a estados excitados. La fracción de radiación que logra traspasar la muestra se denomina transmitancia ($T = \frac{I}{I_0}$)⁵⁶ y se puede relacionar con la absorbancia mediante la siguiente expresión: $Abs = -\log(T)$ ⁵⁶. Por su parte, la absorción de luz por las moléculas está relacionada con la concentración de la especie absorbente de la muestra mediante la ley de Lambert-Beer:⁵⁶

$$Abs = \epsilon \cdot b \cdot C$$

[6]

Donde **C** respresenta a la concentración de la especie absorbente, **b** es el camino óptico y ϵ es el coeficiente de absortividad molar (siempre que las unidades de concentración se expresen como mol/l)

En lo que respecta a las Nanopartículas (Nps), la técnica de espectroscopía está basada en la generación de fenómenos conocidos como Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, por sus siglas en inglés Surface Plasmon Resonance). El SPR consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción dentro de las nanopartículas cuando éstas son excitadas con luz (radiación electromagnética). La naturaleza de la banda SPR se puede explicar con base en la siguiente teoría: Cuando una partícula metálica es expuesta a la luz, el campo electromagnético alternante de la luz incidente interacciona con la partícula e induce una oscilación colectiva de los electrones libres del metal (electrones de la banda de conducción) con una cierta frecuencia, lo que se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro⁵⁷. Esta oscilación es debida a la diferencia neta de carga que se genera sobre los bordes de las partículas que actúa como una fuerza restauradora. La oscilación dipolar, por lo tanto, está en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que depende tanto del tamaño como de la forma de las nanopartículas (*Figura 16*). De esta manera, la longitud de onda a la que se obtiene dicha resonancia se la conoce como banda de absorción o resonancia plasmónica. Para algunos metales como el cobre, oro o plata, la frecuencia de resonancia del plasmón aparece en el visible y ésta es la razón por la que las disoluciones coloidales de estos metales muestran intensos colores.⁵⁸

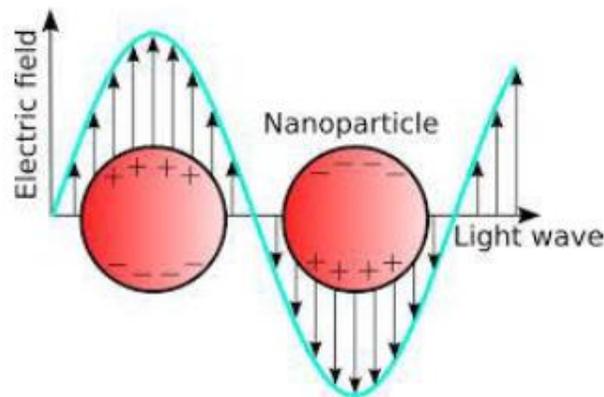


Figura 16. Efecto de Resonancia del Plasmón Superficial.

1.5.7. Difracción de Rayos X.

La difracción de rayos X es una técnica esencial y rutinaria para la caracterización de sólidos y en particular, para la identificación de fases cristalinas. En principio, los cristales de un sólido están constituidos por un conjunto de planos atómicos en cierta orientación que tienen la propiedad de difractar los Rayos X en un ángulo determinado de acuerdo a la distancia entre los planos (*Figura 17*)⁵⁹; entonces consideremos una familia de planos paralelos de una red cristalina, definido por los índices de Miller (hkl), los cuales están separados por distancias iguales **d**. La diferencia de caminos entre los rayos reflejados por dos planos adyacentes es $2 \cdot d \cdot \sin(\theta)$, donde θ es el ángulo de los rayos incidentes medido respecto a los planos de dispersión. La interferencia aditiva de los rayos difractados se consigue sólo cuando esta diferencia de caminos consiste en un número entero **n** de longitud de onda. Así pues, la condición para que exista interferencia constructiva de la radiación incidente viene dada por la Ley de Bragg^{60 61}

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{Sen}(\theta)$$

[7]

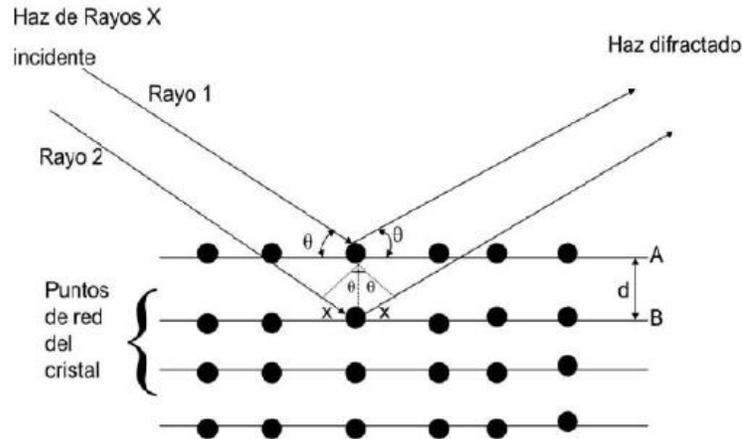


Figura 17. Difracción de los Rayos X incidentes en los planos de Red Cristalina.⁶²

1.5.8. Microscopía Electrónica de Barrido.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, proporcionando información morfológica del material analizado.⁶³ En general, los microscopios electrónicos cuentan con un cañón de electrones, una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra, y un sistema que registra las imágenes que producen los electrones al interactuar con la muestra (*Figura 18*). Una parte importante de estos aparatos lo constituye el sistema de vacío necesario para que los electrones no puedan ser desviados por las moléculas de aire.

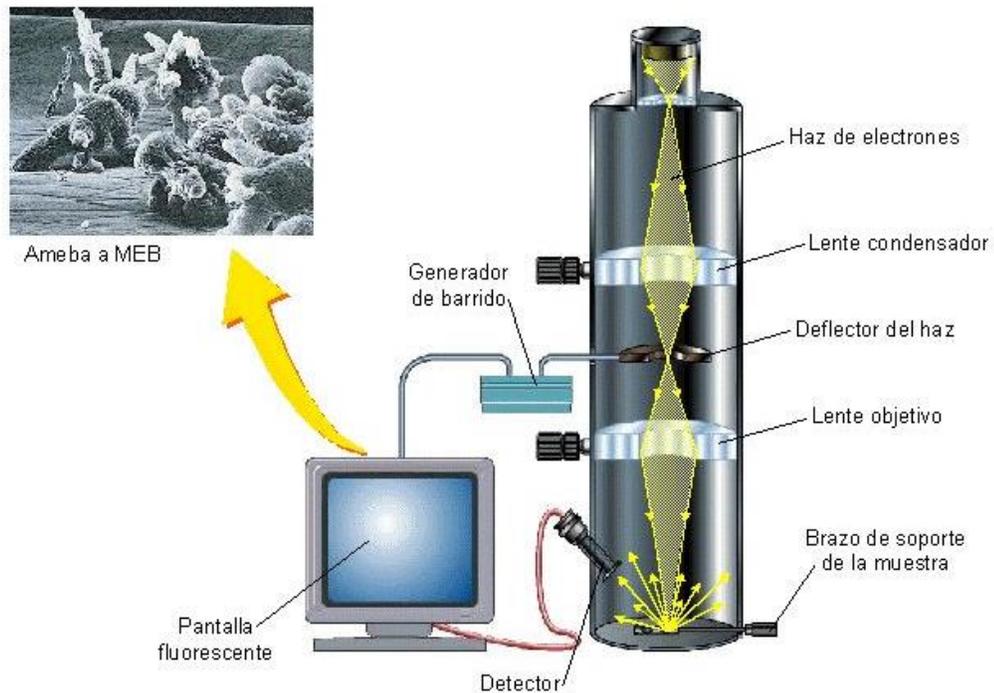


Figura 18. Esquema del funcionamiento y las partes de un microscopio electrónico de barrido.

En el caso de un microscopio electrónico de barrido, la superficie (o el microvolumen) de la muestra que se desea analizar es irradiada con un fino haz muy concentrado de electrones, realizando un barrido de la misma mientras sigue una trayectoria de líneas paralelas. A medida que los electrones chocan y penetran en la superficie de la muestra, se generan distintas señales emitidas por ésta: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones Auger, Rayos-X característicos y fotones de diversas energías.⁶³ Las principales utilidades de la MEB son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y el sencillo método de preparación de las muestras. El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios SEI (Secondary Electron Image) para obtener imágenes de alta resolución; un detector de electrones

retrodipersados BEI (Backscattered Electron Image) que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie; y un detector de energía dispersiva, EDS (Energy Dispersive Spectrometer) que recoge los Rayos X generados por la muestra con el fin de realizar diversos microanálisis en cuanto a la distribución de elementos que componen a la muestra.⁶³

Esta técnica es útil para la caracterización de nanopartículas metálicas a través de la observación de su forma, tamaño, rugosidad y cristalinidad. Igualmente, puede ser ampliamente utilizado para obtener información acerca de la morfología de la superficie de electrodos utilizados en experimentos electroquímicos.

CAPÍTULO II

SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos Empleados.

Todos los reactivos usados eran de grado analítico y todas las soluciones preparadas a partir de éstos, usaron agua tridestilada proporcionada por el Centro de Equilibrios en Solución de la Facultad de Ciencias-UCV.

Tabla 2. Información concerniente a los reactivos empleados durante la realización del proyecto.

Reactivo	Fórmula	Marca	Pureza (%)
Acetato de Amonio	$\text{CH}_3\text{CO}_2(\text{NH}_4)$	Riedel-de Haën AG Seelze-Hannover	98
Ácido Ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	Merck	99,7
Citrato de Sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Fischer Scientific Company	99
Ácido Clorhídrico fumante (37%)	HCl	Merck	--
Almidón	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	Merck	99
Alúmina	Al_2O_3	Merck	--
Argón (en bombona)	Ar	AGA	UAP
Cloruro de Hierro (II) tetrahidratado	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Aldrich Chemical Company	99

Cloruro de Hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	Riedel-de Haën	98
Cloruro de Potasio	KCl	Aldrich	99,999
Cloruro de Sodio	NaCl	Riedel-de Haën AGA	99,5
Cobre (Alambre)	Cu	BDH Chemicals Ltd	--
Dodecilsulfato de Sodio	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Merck	99
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Sigma-Aldrich	--
Ferrocianuro de Potasio trihidratado	K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	Merck Raecenzien	99
Ferricianuro de Potasio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Fluka AG Buslas	99
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck	99
Grafito (en Barra)	G	National Trade-Marck	--
Heptano	C ₇ H ₁₆	Merck	--
Hidróxido de Sodio	NaOH	Merck	99
Metanol	CH ₃ OH	Fluka	99,8
n-propanol	C ₃ H ₇ OH	Riedel-de Haën AG Seelze-Hannover	--
Yoduro de Sodio	NaI	Merck	99

2.2. Equipos Empleados.

A continuación se listan todos los equipos utilizados durante la realización del proyecto, así como la función que desempeñaron:

- *Potencióstato/Galvanóstato AutoLab, modeloAUT 73063, controlado por computadora mediante el Software AutoLab versión 4.9, y utilizado en los*

experimentos electroquímicos que involucraron técnicas a potencial controlado: *voltamperometría cíclica* y *voltamperometría de onda cuadrada*.

- *Microscopio Electrónico de Barrido, modelo Quanta 250 FEG con Detector Everhart-Thornley de electrones secundarios*, para determinar el tamaño y forma de las nanopartículas y del óxido de grafeno sintetizados; así como para el estudio de la morfología de los electrodos de grafito modificados superficialmente. El microscopio está acoplado a un detector EDS para la aplicación de *espectroscopía de dispersión de energía de Rayos X* en la semi-cuantificación de los elementos que constituyen a las muestras.
- *Difractómetro Bruker-AX5 modelo D8 con tubo Cu*, para la caracterización por difracción de Rayos X al óxido de grafeno.
- *Espectrómetro Hewlet Packard*, con la función de obtener el espectro UV-Visible del óxido de grafeno y de las nanopartículas sintetizadas.
- *Montaje Experimental de Dispersión de Luz Dinámica controlado por LabView 1.5, del Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Facultad de Ciencias-UCV*, usado para la caracterización de nanopartículas en solución a través de la determinación de su distribución de tamaños.
- *Rotavapor Bouchi Laboratoriums-Technik AG modelo CH-9239 Flawil/Shweiz*, usado para destilar y, de esta manera, purificar determinados solventes: *etanol, metanol, heptano*.
- *Ultrasonido Cole-Parmer modelo 8891*, para sonicar las dispersiones preparadas de los distintos agentes modificantes.

- *Estufa Marca Heraeus GMBH Hanau*, para el secado de muestras a temperaturas de 100°C.
- *Mufla VULCAN 3-550A*, usada para generar altas temperaturas de calentamiento.
- *Centrífuga*, para separar partículas sólidas dispersadas en una fase líquida.
- *pHmetro Mete Lab modelo M250*, para la medición del pH en las soluciones.
- *Potencióstato EG&G Princeton*, modelo 362; para aplicar la diferencia de potencial necesaria en la electrólisis de las NpsCu.
- *Fuente de Poder, Elcetro Products Laboratories modelo D-612T*, para establecer la diferencia de potencial necesaria en la electroexfoliación del grafito

2.3. Procedimiento Experimental.

2.3.1. Extracción de Gliadina a partir de muestras de harina de trigo

La extracción de gliadina a partir de harina de trigo comercial Robin Hood se realizó de acuerdo a dos metodologías distintas reportadas en la bibliografía:

Método 1 (Reportado por Dupont, F. M.):⁶⁴

Se pesaron por triplicado 5,00g de la muestra de harina de trigo, a cada una se añadió 50 mL de una solución de NaI (0,3 M) y 1-propanol (7,5 %v/v). La mezclas se

separaron por centrifuga por 20 min a 5000 rpm; se agruparon los sobrenadantes y se mezclaron con 150 mL de una solución de acetato de amonio 0,1 M en metanol, para inducir la precipitación de la gliadina. Inmediatamente, la mezcla fue refrigerada a una temperatura de -20 °C por 48 h. Por último el sólido se separó por centrifuga 20 min a 5000 rpm.

Método 2 (Reportado por Van Eckert, R.):⁶⁵

Se pesaron 8,00 g de harina de trigo comercial, se mezclaron con 10 mL de heptano, con el objeto de extraer las grasas, se agitó por 20 min y se centrifugó, desechando el sobrenadante. A continuación, se añadieron 100 mL de una solución de NaCl (0,4 M), se realizaron tres extracciones sucesivas en la muestra. Para ello, la mezcla fue agitada nuevamente durante 20 min y luego, centrifugada. En el sobrenadante, se encontraban disueltas el conjunto de proteínas que corresponden a la categoría de albúminas y globulinas; por lo tanto, dicho sobrenadante también fue desechado.

Se realizaron dos extracciones sucesivas al sólido obtenido, con 100 mL de etanol (60 %v/v), se agitó por 20 min y se centrifugó. Por último, los extractos líquidos se combinaron y se filtraron usando un embudo de placa porosa de 60 mesh, reservando la fase líquida.

No obstante, en lugar de inducir la precipitación de la gliadina por enfriamiento del medio, se modificó el procedimiento de Eckert: el líquido sobrenadante recogido en el paso anterior fue llevado a un sistema de vacío, para producir una lenta evaporación del solvente etanol-H₂O y así obtener a la gliadina seca. El montaje consistió en un recipiente de vidrio hermético con una sola abertura, el cual se conectó una bomba de vacío.

Caracterización de la Gliadina:

Las muestras de gliadina, extraída mediante ambos métodos, fueron caracterizadas por la técnica de Electroforesis PAGE-SDS, gracias a la colaboración del laboratorio GENMOLAB, consiguiendo la identificación de la proteína a partir de la determinación de su peso molecular. Para el análisis se utilizó un gel de acrilamida al 15%. Se trabajó con muestras de gliadina (disueltas en etanol al 60%v/v) de concentración 2 mg/ml, las cuales se mezclaron con una solución buffer de 63 mN Tris-HCl que contenía 2,5% de SDS. El gel se tiñó con una solución del colorante Azul de Coomassie.

2.3.2. Preparación de óxido de grafeno por electroexfoliación de grafito.⁶⁶

La exfoliación de grafito se consiguió mediante electrólisis en una celda de dos compartimientos separados por una placa de vidrio poroso; como electrodos se utilizaron barras de grafito de 3 mm de diámetro, las cuales fueron sumergidas en la solución a una profundidad necesaria para que el área inicial sumergida de dichas barras, fuese de 5 cm². Para la electrolisis se aplicó un potencial de celda de 10 V durante 5 horas, en una solución de 0,1 M de dodecilsulfato de sodio (SDS). El precipitado obtenido en el compartimiento anódico, se trató en ultrasonido durante 15 min. Posteriormente se filtró y se lavó, primero con agua, y luego con etanol. El producto filtrado se dejó secar en estufa a 90 ° C por 24 horas.

La caracterización del óxido de grafeno se realizó mediante las siguientes técnicas:

- *Espectroscopía UV-visible*, para la identificación del óxido de grafeno a través de su espectro característico.
- *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*, para conocer la estructura tridimensional del sólido.
- *Espectroscopía de dispersión de energía de Rayos X (EDS)*, para determinar la composición elemental del óxido de grafeno. La técnica pudo aplicarse gracias a la colaboración del Departamento de Ciencias de los Materiales de la Universidad Simón Bolívar.

2.3.3. Síntesis de nanopartículas de óxido de Hierro.

Este procedimiento se ha desarrollado en el laboratorio del Centro de Equilibrios en Solución: Se prepararon 25 ml de una solución de gliadina al 0,1 % y citrato de sodio al 1% en etanol al 60%: Seguidamente, una masa de 0,1167 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disolvió en la solución anterior, bajo agitación constante, una vez disuelto se agregaron 0,4290 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; en este punto el pH se ajustó a 13, utilizando una disolución de NaOH al 20%. A continuación, el volumen fue llevado a 50 mL y se mantuvo bajo agitación por 8 horas.

Transcurrido este tiempo, se separó el sólido mediante centrifuga a 5000 rpm por 3 minutos, descartando el sobrenadante; el sólido se redispersó en H_2O ajustando el pH entre 6-7 utilizando una solución de HCl al 10%. Posteriormente, se agregaron 30 mL de etanol y se procedió a separar el sólido mediante centrifuga a 5000 rpm por 3 minutos. Finalmente, este sólido se dejó secar en la estufa a 90 °C por 24 h.

La caracterización de las nanopartículas se realizó mediante las siguientes técnicas:

- *Dispersión de luz dinámica (DLS)*, con la finalidad de obtener la distribución de tamaño de las partículas dispersas en solución.
- *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*, para determinar el tamaño y conocer la estructura tridimensional de las nanopartículas obtenidas.
- *Espectroscopía de dispersión de energía de Rayos X (EDS)*, para determinar la composición elemental de las nanopartículas con base en su espectro.
- *Espectroscopía UV-Visible*, para la identificación de las nanopartículas a partir de los plasmones de superficie responsables de las señales en el espectro.

2.3.4. Síntesis de nanopartículas de Cobre.

Este procedimiento se ha desarrollado en el laboratorio del Centro de Equilibrios en Solución. La preparación fue realizada vía electroquímica, empleando electrólisis a densidad de corriente constante. Como electrodo de trabajo y contraelectrodo se emplearon dos alambres de cobre. El cátodo (electrodo de trabajo) consistió en un alambre recto cuya área sumergida era de $1,0 \text{ cm}^2$, y alrededor del cual se dispuso al ánodo (contraelectrodo), en forma de espiral. El área del ánodo fue dos veces mayor a la del cátodo. En la celda se agregaron 25 mL de una solución al 1% v/v en ácido acético, 0,5% en ácido ascórbico y 1% en gliadina.

Se realizó una electrólisis a densidad de corriente constante de 10 mA/cm^2 por 6 horas, bajo agitación constante. Luego, el sólido formado fue separado de la solución mediante centrifugación a 5000 rpm por 3 minutos, descartando el sobrenadante, se realizaron tres lavados agregando 5 mL de agua redispersando y centrifugando. Por último, el sólido obtenido fue secado en la estufa a 90°C durante 24 horas.

La caracterización de las nanopartículas de cobre se realizó mediante las mismas técnicas aplicadas a sus homólogas de la *sección 2.3.3*.

2.3.5. Preparación de los Electrodo: Modificación de la Superficie.

Los electrodos consistieron en barras cilíndricas de grafito de longitud media igual a 1,5 cm, con caras circulares de 3 mm de diámetro; una de las cuales, era modificada superficialmente. La cara de trabajo se lijó con papel lija de 360, 1200 y 2000; posteriormente se pulió con alumina de 0,5 micras sobre lana hasta lograr un acabado tipo espejo. A continuación, el electrodo era lavado en agua tridestilada y se le dejaba secar a temperatura ambiente.

Con cada uno de los tres agentes modificantes (óxido de grafeno, Nps de óxido de hierro y Nps de cobre) se prepararon dispersiones de 2 mg en 2 mL de etanol. Las mezclas se agitaban por 2 minutos y, posteriormente, eran llevadas al ultrasonido durante otros 10 min, para lograr una buena dispersión de las partículas. Por último, para añadir el agente modificante, se depositaba una gota de 5 μl de la dispersión de interés sobre la superficie circular de la cara pulida del electrodo, y se le permitía secar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

En la siguiente tabla se resumen los tres tipos de electrodos modificados que fueron preparados:

Tabla 3. Electrodos de trabajo preparados a partir de la modificación superficial de un electrodo de grafito.

Electrodo	Agente modificante	Nombre del electrodo
Blanco	Ninguno	G
1	Óxido de Grafeno	GO
2	Óxido de Grafeno / Nps Fe_xO_y	GO / Fe
3	Óxido de Grafeno/ Nps Cu	GO / Cu

En el caso de los electrodos de GO/Fe y GO/Cu, el orden de deposición de los agentes modificantes consistió en: primero, añadir el óxido de grafeno y posteriormente, las nanopartículas.

La caracterización de la superficie de los electrodos se llevó a cabo a través de las siguientes técnicas:

- *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*, para estudiar la morfología de la superficie de los electrodos.
- *Voltamperometría cíclica (VC)*, para conocer la respuesta electroquímica del electrodo en la solución de trabajo, así como para definir la ventana de potencial para la aplicación de la voltamperometría de onda cuadrada. La VC se realizaron tanto en una solución de KCl al 1,00 M como en una solución equimolar al 0,01 mM de $K_4[Fe(CN)_6]$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ con KCl 1,00 M (solución **A**).

2.3.6. Detección de la Gliadina.

Se dispuso de una celda electroquímica de trabajo compuesta por tres electrodos: como electrodo de pseudoreferencia un alambre de Ag (de área 3 mm^2), como contraelectrodo un alambre de Pt (área de $0,5 \text{ cm}^2$) y como electrodo de trabajo el electrodo modificado. Dentro de la celda, se adicionaron 3 mL de la solución **A** y se purgó con argón durante 8 minutos; durante la purga el electrodo de trabajo permanecía fuera de la solución. Entonces, el electrodo de trabajo era sumergido durante 3 minutos, y luego se alzaba cuidadosamente por encima del nivel del agua, para generar un acceso capilar que permitiera que sólo la superficie de su cara modificada estuviera en contacto con la solución. A continuación, se procedió a medir su respuesta en ausencia de la proteína, utilizando voltamperometría de onda (VOC) cuadrada bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones de la voltamperometría de onda cuadrada para evaluar la detección de la gliadina por parte de los electrodos de grafito modificados superficialmente.

Parámetros	Valor Establecido
Tiempo de Equilibrio	12 s
Frecuencia	10 Hz
Potencial Inicial	-0,3875 V
Potencial Final	0,3625 V
Altura de Paso	0,45 mV
Amplitud	49,95 mV

Para evaluar la respuesta del mismo electrodo ante la presencia de gliadina: éste fue retirado de la solución para limpiarlo con agua tridestilada, se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, con una micropipeta se

añadieron 5 μ l de solución de gliadina de 11,0 ppm en etanol (al 60% v/v) en su superficie modificada. Dejándolo secar por 20 minutos, y por último, se repitieron los pasos del procedimiento descrito anteriormente para efectuar las mediciones.

Luego, para obtener la respuesta del electrodo en función de otras concentraciones de gliadina, se realizaban nuevas adiciones *ex situ* de la solución de proteína.

2.3.7. Cuantificación de la gliadina a partir el electrodo de GO/Fe. Determinación de las cifras de mérito.

Estudio de Precisión:

La precisión del método se evaluó de dos maneras distintas: (A) La comparación entre distintas réplicas del experimento bajo las mismas condiciones, para una concentración de gliadina de 11,0 ppm y usando un mismo electrodo. (B) La comparación entre las respuestas de tres electrodos distintos, usados en días consecutivos, para la determinación de la señal de una misma solución de gliadina (11,0 ppm).

Construcción de una Curva de Calibrado:

Usando un electrodo de GO/Fe, se procedió a medir la señal para distintas concentraciones de gliadina, comprendidas en el intervalo de 0,0-50,0ppm. La respuesta del electrodo fue graficada en función de la concentración de gliadina y se modeló la curva a través de una regresión lineal, calculada mediante el método de mínimos cuadrados (con el programa OriginPro9.5). A continuación, se determinó el

rango lineal, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOC) y la sensibilidad del método.

Estudio de Reproducibilidad:

Se estudió el comportamiento de tres electrodos de GO/Fe diferentes, preparados el mismo día. El estudio se realizó en días distintos, de forma consecutiva. Luego, a partir de los datos obtenidos, se construyeron curvas de calibrado para cada electrodo y se comparó los parámetros característicos de cada una.

2.3.8. Procedimientos de reutilización del electrodo GO/Fe.

En primer lugar, se procedió a registrar la respuesta de un electrodo de GO/Fe para distintas concentraciones de gliadina, comprendidas en el rango de 11,0 ppm a 44,0 ppm. Luego, se puso a prueba dos métodos para recuperar el electrodo con el fin de evaluar la reutilización del mismo:

Método 1:

El electrodo de GO/Fe se mantuvo sumergido en etanol (60 %v/v) por 48 horas; tras lo cual, se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se procedió a evaluar su respuesta.

Método 2:

El electrodo de GO/Fe fue lavado en primer lugar con una solución de HCl (a pH 6) durante pocos 2 minutos, seguido de un lavado con etanol (60 %v/v) por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se dejó secar al electrodo durante 12 horas a temperatura

ambiente. Por último, se procedió a evaluar su respuesta para diferentes concentraciones de gliadina.

2.3.9. Estudio de la Selectividad: Pruebas de Interferencias.

Se procedió a estudiar el efecto en la señal de una solución de gliadina (11,0 ppm), cuando era mezclada con almidón (en concentraciones de 11,0 ppm y 22,0 ppm) y glucosa (11,0 ppm). Para ello, se empezó obteniendo las señales propias del blanco y de la solución de gliadina. Luego, el electrodo era sometido a lavado con agua destilada, y después de secarse, se le adicionó un volumen de 5µl de la solución que contenía al posible interferente. A continuación, se obtuvo la nueva respuesta por parte del electrodo, y se comparó con los resultados previos.

2.3.10. Análisis de una Muestra Real.

Se escogió a la harina de trigo Robin Hood como muestra de estudio para el análisis. De esta manera, una masa de 23,73 mg fue sometida a un pretratamiento que buscaba la extracción de la gliadina de la harina, usando 20 mL de etanol 60 %v/v. El sobrenadante de esta mezcla fue separado por centrifugación y reservado para la prueba correspondiente. Entonces, usando VOC bajo las condiciones ya establecidas en la *Tabla 4*, se procedió a medir tanto la señal del blanco como de la muestra. La señal de la muestra fue sometida a corrección y evaluada, por interpolación, en las curvas de calibración desarrolladas en la sección 2.3.7. Luego, a partir de los cálculos adecuados, se determinó el contenido de gliadina en la harina de trigo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de las Metodologías para la obtención de gliadina a partir de muestras de harina de trigo

Los procedimientos escogidos para efectuar la extracción de gliadina están basados en las propiedades de solubilidad de los distintos componentes proteicos que constituyen a la harina de trigo. Las proteínas representan un total del 10% de la masa de la harina de trigo. De este porcentaje, una porción de aproximadamente 90% corresponde al gluten, y el resto está distribuido en albúminas y globulinas.⁶⁴

3.1.1. Metodología aplicada por Dupont. et al:⁶⁴

La metodología está basada en la extracción directa de las gliadinas que contiene la harina, a partir de una solución de NaI (0,3 M) y 1-propanol (7,5 %v/v), en la que la proteína es soluble. En las extracciones efectuadas, la muestra se adhería a las paredes de los recipientes de vidrio producto de la consistencia pastosa y pegajosa que adquiría la harina al hidratarse, lo que implicaba pérdidas importantes de la misma.

La mezcla de los extractos con NH_4AcO 0,1 M en metanol buscaba inducir la precipitación de la proteína por el cambio de polaridad del medio, para lo cual también se aplicó refrigeración. Al finalizar el procedimiento, se obtuvo una cantidad de gliadina de 34 mg; lo que representa un 5%* de rendimiento para el proceso; por ende, las pérdidas a lo largo del procedimiento fueron relevantes y la precipitación inefectiva. Por otra parte, no se dispone de datos para comparar el rendimiento obtenido, puesto que

Dupont no suministró información acerca de este aspecto. A la proteína (gliadina) extraída por este método se le asignó el nombre de *muestra G1*.

(*) Dupont et al. determina que la cantidad de gliadina que compone a la harina de trigo es aproximadamente de 4,8%

3.1.2. Metodología aplicada por Eckert:⁶⁵

Se mencionó que la harina de trigo estaba constituida principalmente por 4 tipos de proteínas: albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Las dos primeras proteínas, a diferencia de las gliadinas y gluteninas, son solubles en una solución acuosa de NaCl al 0,4 M⁶⁴. Aprovechando este factor, el método considera la aplicación de una extracción previa usando la solución salina, permitiendo entonces descartar al conjunto albúminas/globulinas. Por su parte, la extracción de gliadina, se efectuó a partir de etanol al 60%. El sobrenadante se filtró seis veces.

El deficiente rendimiento obtenido en la aplicación del método de Dupont, nos llevó efectuar la siguiente modificación del procedimiento original propuesto por Eckert: la precipitación de la proteína se produjo entonces mediante evaporación del solvente mediante vacío, en lugar de someter la solución a enfriamiento. El proceso resultó muy lento, con una duración de 48 horas; sin embargo, se obtuvieron 149 mg de gliadina, lo cual representa un rendimiento de 38%. Este valor es comparable al reportado por Eckert en su trabajo: 58%.⁶⁵ Cabe acotar que la mayor dificultad presentada a lo largo del método consistió nuevamente en la pérdida de materia en los distintos pasos que involucraban la mezcla de la harina con soluciones acuosas.

La muestra de gliadina obtenida por este método se le designó con el nombre de *muestra G2*.

3.1.3. Caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

La técnica se utilizó para confirmar la presencia de la gliadina obtenida en los dos métodos de extracción aplicados, el mismo consistió en separar los componentes del sólido extraído en función de su peso y la carga que adquieren (por la solución buffer) ante la aplicación de una diferencia de potencial constante. Por último, también se pudo obtener información cualitativa del grado de pureza de la proteína. A continuación, en la *Figura 19* se muestra una imagen de los resultados obtenidos posterior a la corrida de la electroforesis:

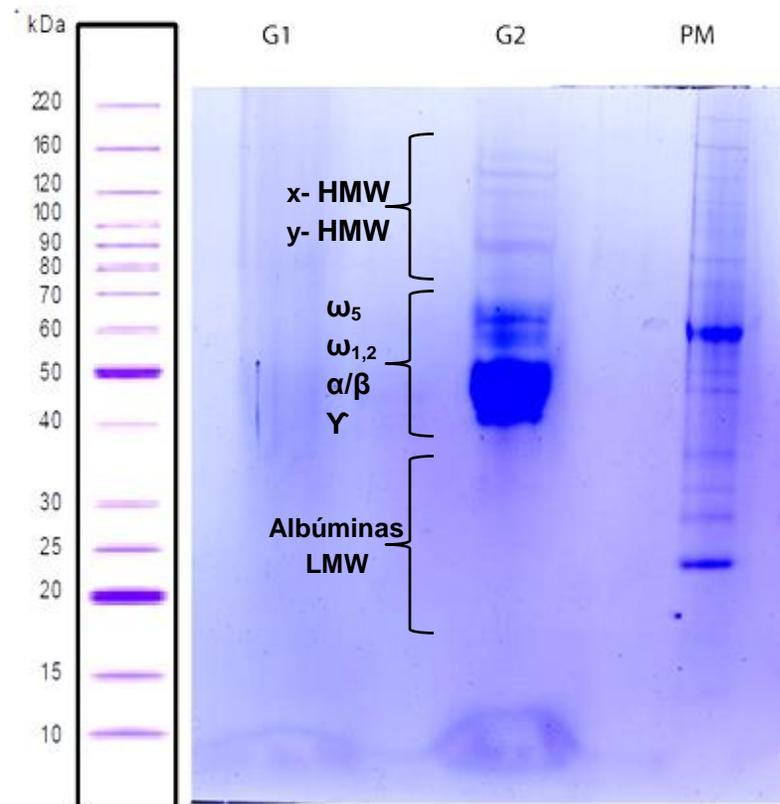


Figura 19. Imagen del gel obtenido mediante PAGE-SDS. El último carril, identificado como "PM", posee marcadores de peso molecular, cuya masa (kDa) se indica en la escala de la izquierda.

El carril izquierdo revela el resultado del análisis electroforético aplicado a la muestra de gliadina G1 extraída mediante el método de Dupont.⁶⁴ En esta corrida, es destacable la ausencia de bandas coloreadas perceptibles a simple vista; indicativo de que en la muestra existía una cantidad insuficiente de gliadina. Por lo que se concluye que la extracción de la proteína mediante el método de Dupont en este caso, no resultó eficiente.

Por su parte, el carril central exhibe el análisis de la *muestra G2*, obtenida a partir del método de Eckert⁶⁵. Aquí se aprecia una serie de bandas que confirman, a diferencia de los resultados en G1, la presencia de una gliadina cuyos distintos componentes han migrado a través del carril con base en su peso molecular. Ahora bien, el conjunto de bandas comprendidas en el rango de pesos moleculares de 35-60 kDa, por comparación con los datos de la *Tabla 5*, confirma que en la muestra están presentes gliadinas del tipo ω_5 , $\omega_{1,2}$, α/β , y γ .

Tabla 5. Peso molecular (kDa) de los distintos tipos de gliadina, reportado por Eckert.⁶⁵

Tipo de Gliadina	Peso Molecular (kDa)
ω_5	54,858 – 54,967
$\omega_{1,2}$	39,109 – 42,758
α/β	30.169 – 41,280
γ	29,409 – 39,024

Por su parte, la intensidad de las bandas ubicadas en la zona desde 35 kDa hasta 50 kDa, implica una alta concentración de las gliadinas, respecto a otros componentes detectados, cuyos pesos moleculares se encuentran por encima de los 70

kDa; y que por ende, deben constituir impurezas: en su mayoría, subunidades de proteínas de la glutenina, x-HMW y y-HMW; que se caracterizan por poseer masas molares mayores que las gliadinas.¹³ Además, la ausencia de bandas por debajo de los 30 kDa, permite afirmar que las albúminas, globulinas y subunidades LWM de la glutenina, que son proteínas con pesos moleculares pequeños¹³, están ausentes en la muestra estudiada; por ende, el paso de la metodología experimental, que implicaba la extracción previa del conjunto albúminas/globulinas resultó efectivo.

En conclusión, entre los métodos propuesto por Dupont y por Eckert, sólo el segundo logró la extracción de la gliadina. Esta muestra se caracterizó por tener niveles aceptables de pureza puesto que sólo se registró la presencia pequeñas proporciones de HMW-gluteninas.

3.2. Análisis del método de síntesis del Óxido de Grafeno GO.

A través de la imposición de un potencial de celda constante de 10 V, se llevó a cabo la electrólisis del agua dentro de la celda, es decir, la generación de H₂ en el cátodo y de O₂ en el ánodo. La formación y consecuente liberación de moléculas de oxígeno en la superficie del ánodo, es la causante del decapado del electrodo, a la vez que son oxidados algunos de los átomos de C de las nuevas láminas de grafeno desprendidas. Una vez concluido el tiempo de electrolisis el sólido obtenido fue filtrado y sometido a numerosos procesos de lavado, para así eliminar adecuadamente los restos del surfactante (SDS), con esto se obtuvo del proceso 138(±1) mg de GO.

3.2.1. Caracterización de GO por microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):

La MEB se utilizó como herramienta para obtener información relacionada con la morfología de la muestra. A su vez, mediante EDS fue posible determinar la composición química de ésta. Para la formación de las imágenes, el microscopio utilizó un detector de electrones secundarios: Everhart-Thornley. Además, el análisis se realizó mediante condiciones de *alto vacío* y con una *energía de haz incidente* igual a 20 kV. Por último, la muestra fue depositada sobre una placa de silicio.

La siguiente micrografía corresponde a una muestra representativa del óxido de grafeno sintetizado:

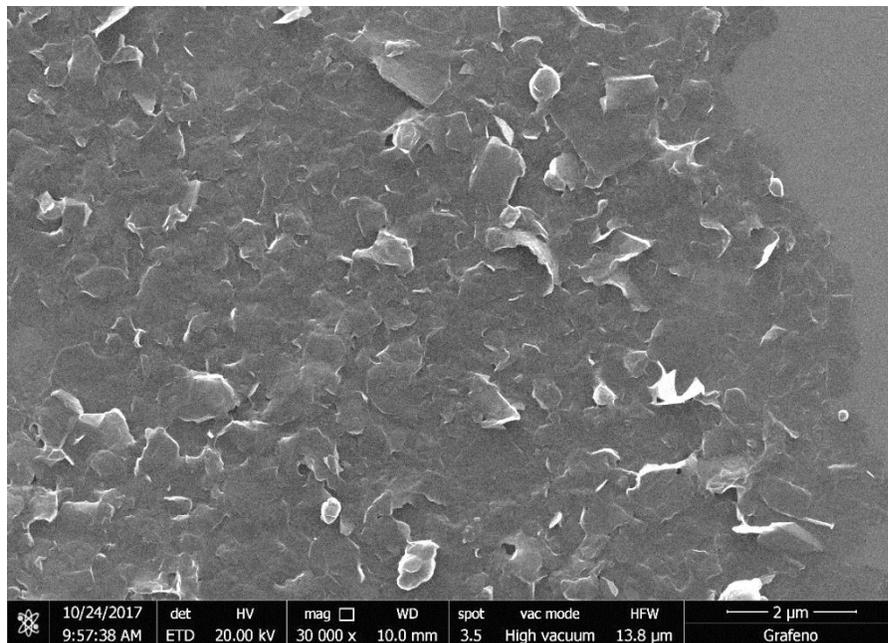


Figura 20. Micrografía del óxido de grafeno (GO) obtenida por MEB.

La micrografía muestra al GO como un sólido en forma de hojuelas. Esta forma es, posiblemente, una consecuencia del proceso de síntesis del GO que implicó el decapado de las barras de grafito mediante electrólisis. Ahora bien, la composición elemental del GO, obtenida a partir de la técnica de EDS puede apreciarse a través del siguiente espectro:

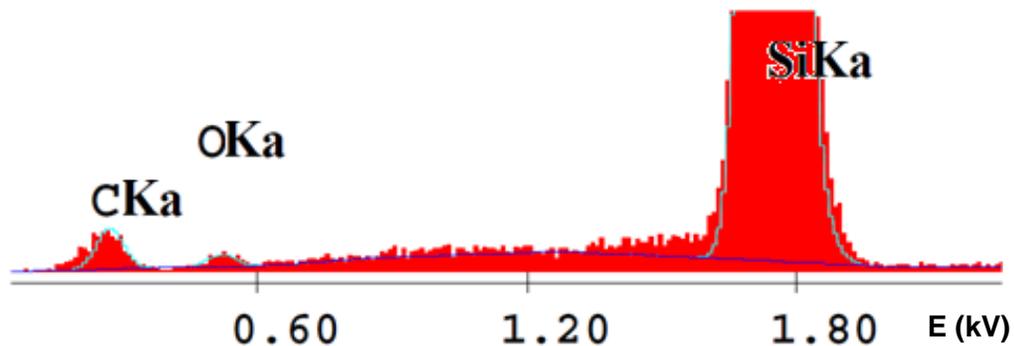


Figura 21. Espectro del óxido de grafeno soportado sobre una placa de Si, obtenido por la EDS.

La señal más intensa se le atribuye al silicio, puesto que la capa de muestra, al ser muy delgada, permite el paso de una gran cantidad de rayos X al soporte. Ahora bien, los picos importantes se ubican a 282 eV y 523 eV; el primero pertenece al carbono, mientras que el otro, al oxígeno. La relación atómica C:O en la muestra es de 19:1. Este último resultado puede entenderse a partir de la estructura del GO (ver la *Figura 22*), cuyo modelo más aceptado es el propuesto por Lerf-Klinowski.⁶⁷, que describe al GO como una lámina de átomos de carbono que forman un patrón de estructuras hexagonales, algunos de los cuales, están funcionalizados con grupos hidroxilo, epoxi, carbonilo y carboxilo. En dicha figura, es notorio que la cantidad de átomos de C es superior al número de O.

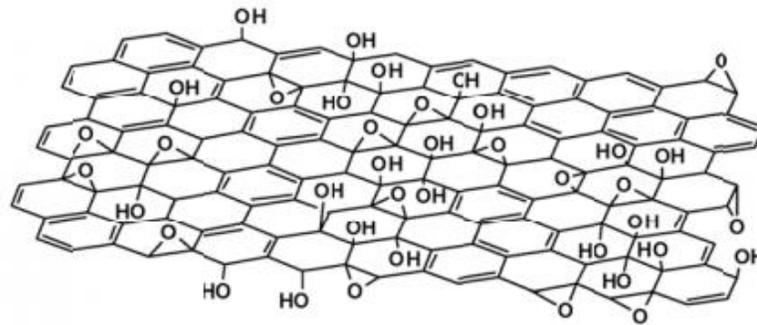


Figura 22. Representación de una lámina de GO según el modelo de Lerf-Klinowski.⁶⁸

3.2.2. Caracterización del GO por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.

El espectro de la muestra de GO dispersada en agua es exhibido en la *Figura 23*. Como la estructura del GO tiene un alto grado de aromaticidad es susceptible de ser detectado por la técnica de espectroscopía UV-visible. Donde el tipo de transición observable corresponde a $\pi \rightarrow \pi^*$, la cual da lugar a una banda de absorción localizada a 231 nm.⁶⁸ Sin embargo, en función del grado de oxidación del GO, que depende directamente del método utilizado para su síntesis, pueden registrarse desplazamientos de la banda a lo largo del espectro,⁶⁶ en nuestro caso, la banda de absorción tiene su pico en la región UV a 265 nm.

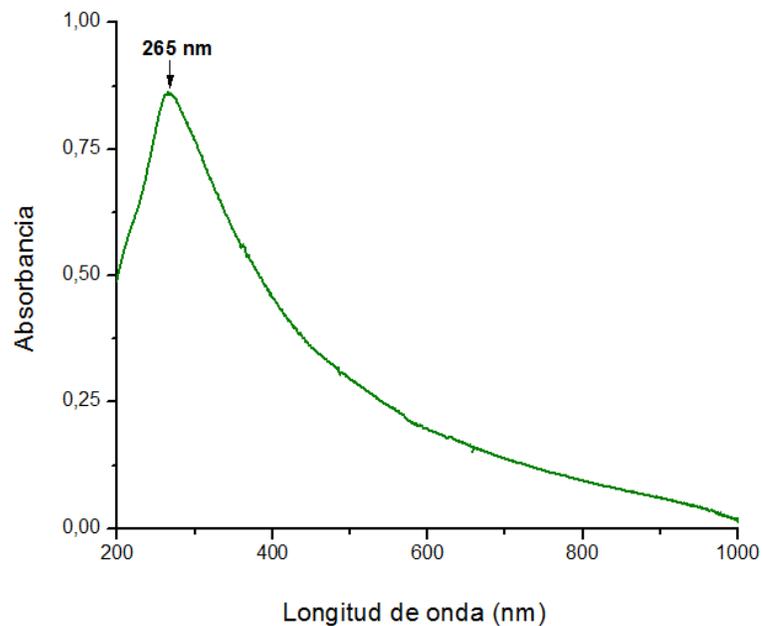


Figura 23. Espectro UV-VIS de una dispersión de GO en agua.

3.2.3. Caracterización del GO por Difracción de Rayos X

En la *Figura 24* se anexa el difractograma de la muestra de óxido de grafeno (curva en negro) comparado con los picos de difracción del grafito (barras en rojo), cuyas posiciones e intensidades relativas fueron tomadas de la ficha de Wyckoff ⁶⁹. Para la medida se utilizó como fuente de emisión de rayos X a la longitud de onda 1,541 Å de la línea $K\alpha$ del Cu.

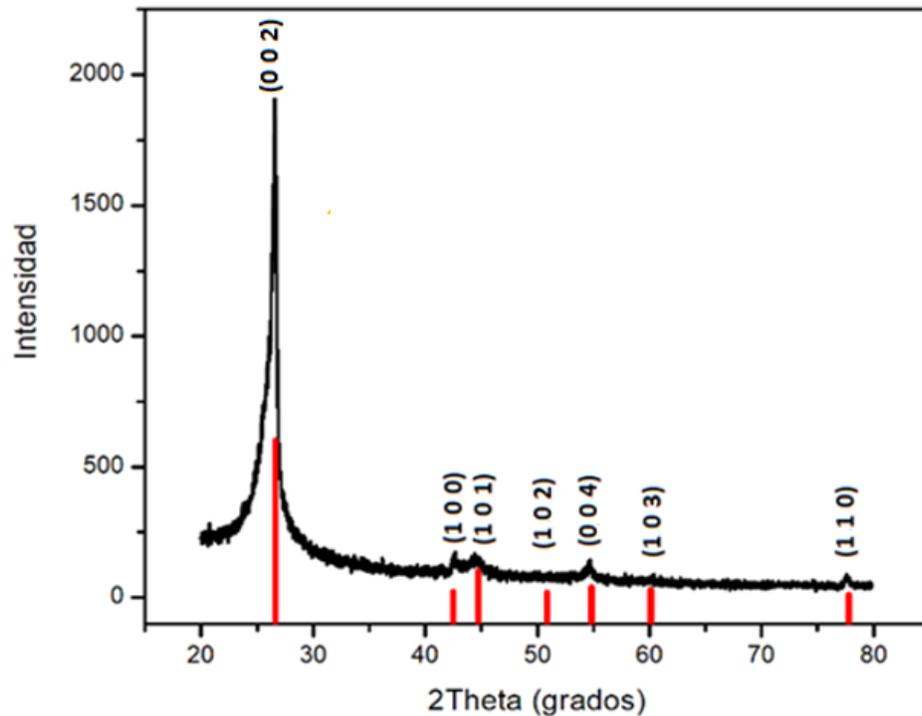


Figura 24. Difractograma del GO (negro) y del Grafito (rojo)

En el difractograma teórico de una muestra constituida netamente por GO, no debe aparecer ninguno de los picos que suministre información acerca de la cristalinidad a lo largo del eje c , es decir, aquel que es perpendicular al plano de grafeno. Esto implica que únicamente deben estar presentes el segundo y el séptimo pico: (100) y (110), respectivamente. Por ende, se deduce que el difractograma obtenido fue generado por cristales tridimensionales de grafito en vez de cristales bidimensionales de grafeno; y en caso de que éstos últimos existan, no pueden ser detectados.

Sin embargo, por simple inspección, el pico a 26,6 grados se presenta bastante ancho y asimétrico. Este pico es el más intenso, corresponde a la familia de planos (002) del Grafito, donde cada uno de éstos planos es una estructura laminar de grafeno.

Precisamente, el ancho del pico proporciona información acerca del tamaño de los cristales en la dirección perpendicular al eje c , es decir, del número de láminas de grafeno que lo constituyen; mientras que, la asimetría sugiere que fue generado por cristales con diferentes valores de la separación “ d ” entre planos de grafeno; y por ende, este pico no es más que la superposición de otros bastante cercanos entre sí. Así pues, usando el programa OriginPro 8.5, se procedió a deconvolucionar al pico (002), según lo mostrado en la *Figura 25*: la curva en color negro representa los resultados experimentales y la curva en color rojo corresponde a la suma de tres picos de diferente posición y diferente ancho. La curva roja se corresponde bastante bien con la curva experimental, por lo que la propuesta de los tres picos azules es razonable, aunque no se descarta que podría aplicarse otras propuestas, tal vez con cuatro o más picos.

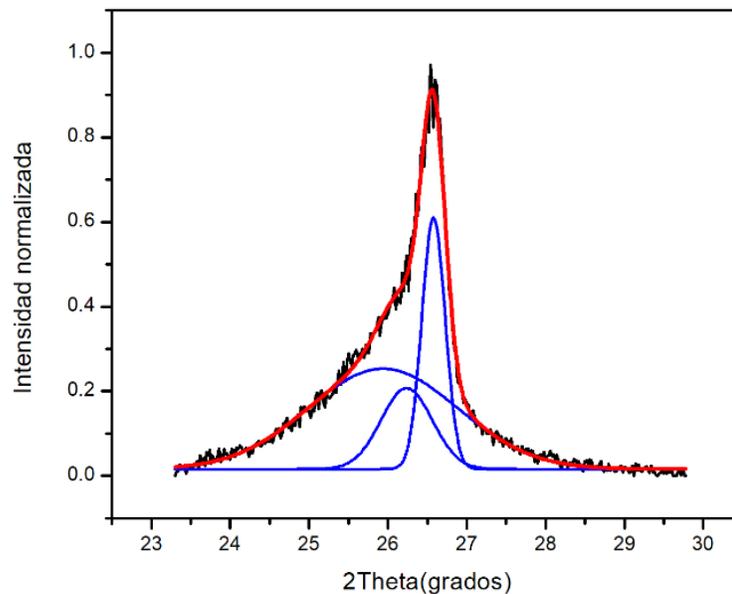


Figura 25. Análisis del pico (002) del difractograma de la muestra de GO.

La posición, ancho a media altura (FWHM, por sus siglas en inglés) y área de cada uno de los picos en azul es la siguiente:

Tabla 6. Características de los picos que componen al pico (002) del espectro de GO.

	2.θ	d (Å)	FWHM	Área Relativa (%)
Pico 1	26,58°	3,35	0,348	23,4
Pico 2	26,24°	3,39	0,766	16,5
Pico 3	25,94°	3,43	2,230	60,1

Con estos datos se puede utilizar la ecuación de Scherrer para estimar el tamaño de los cristales⁵⁹

$$\tau = K\lambda/(\beta \cos\theta) \quad [8]$$

Donde τ es el tamaño del cristal en la dirección perpendicular a la familia de planos (hkl); K es una constante de valor aproximado a 0.9; λ es longitud de onda del haz de Rayos-X (1,541 Å, CuK α); β es el ancho a media altura (FWHM) del pico (hkl), expresado en radianes; y θ es ángulo de Bragg para el pico (hkl).

Entonces, para cada pico se obtuvieron los resultados de la *Tabla 7*. Cabe acotar que, el ancho de cada pico fue sometido a corrección, substrayéndole el ensanchamiento instrumental, el cual se estimó en 0,3025° a partir del pico (002) del difractograma de una muestra de grafito. Ahora bien, con base en la información que sugiere la Tabla, la muestra está compuesta realmente por tres tipos de cristales: dos de los cuales (picos 1 y 2) presentan un alto grado de exfoliación, pues están constituidos por apenas 34 y 11 planos de grafeno, respectivamente.

Tabla 7. Tamaño de cristal y número de capas de grafeno de los Picos de la Figura 5.

	τ (Å)	Capas de Grafeno
Pico 1	474	142
Pico 2	116	34
Pico 3	37	11

Ante estos resultados, se tomó la siguiente precaución en la posterior preparación de los electrodos: Las dispersiones de GO en etanol se sometieron a sonicación; y se les permitió reposar durante algunos minutos, con el fin de que los cristales poco exfoliados sedimentaran primero. Entonces, el sobrenadante (el cual sólo contiene las hojuelas exfoliadas de GO) era utilizado para impregnar la superficie del electrodo.

3.3. Análisis del método de síntesis de las nanopartículas de Fe_xO_y

La síntesis de las nanopartículas se realizó a partir de reacciones de hidrólisis de Fe^{2+} y Fe^{3+} , partiendo en ambos casos de sales de cloruros, bajo condiciones de pH y potencial tales que la formación de óxidos del metal estuvo favorecida termodinámicamente. Estas condiciones se establecieron con base en la información suministrada por el Diagrama de Pourbaix del Hierro (en agua) a una temperatura de 25 °C.⁷⁰ Dicho diagrama no es más que la representación gráfica que indica las regiones

de estabilidad termodinámica de las distintas especies (hidruros, óxidos, hidróxidos, entre otros) como función del potencial y pH del medio.⁷¹

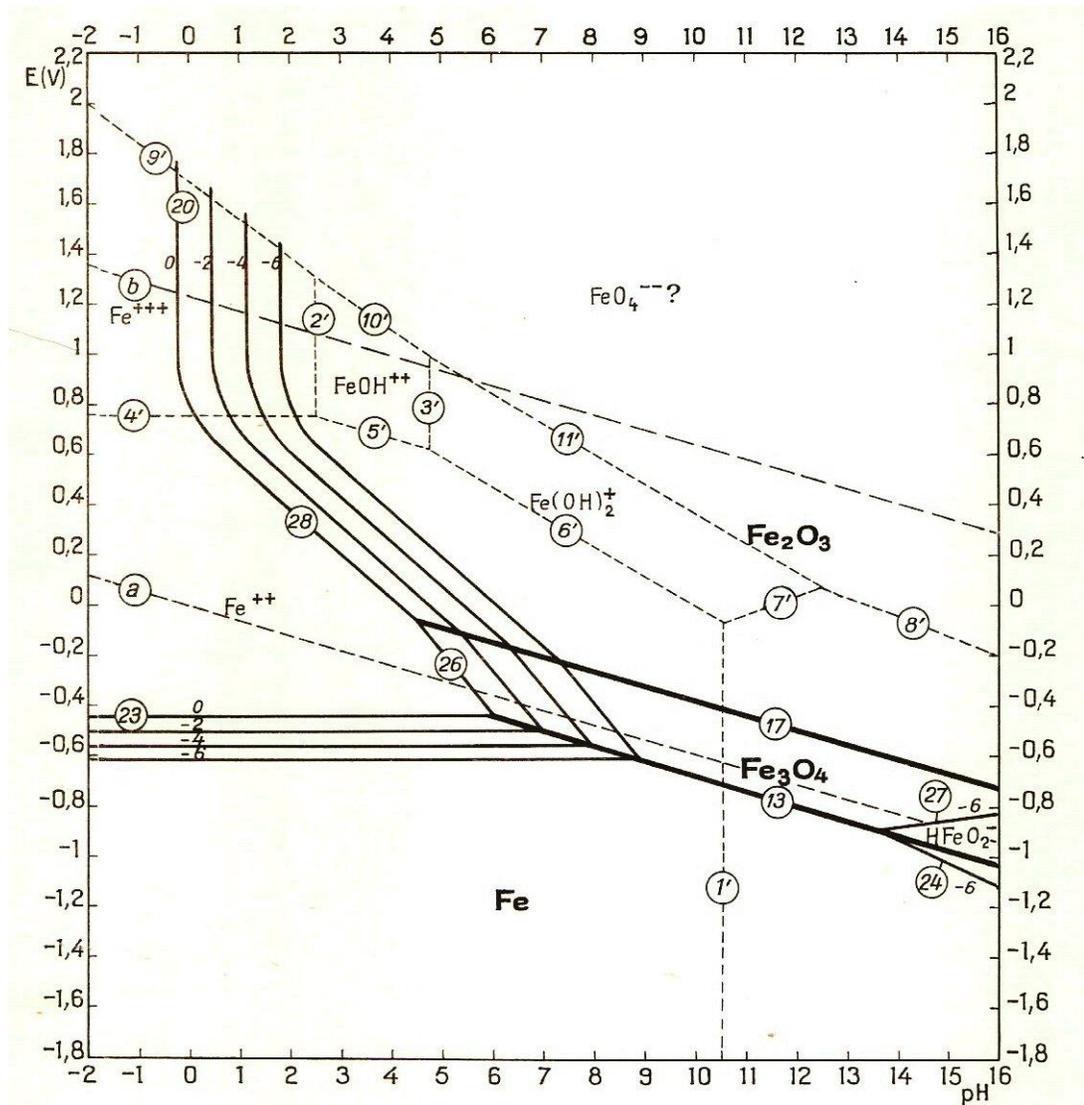


Figura 26. Diagrama de Pourbaix del Fe en agua y a 25°C. Las únicas especies sólidas son Fe, Fe₃O₄ y Fe₂O₃.⁷⁰

Durante la síntesis: (a) se ajustó el pH a 12, y (b) se mezclaron las dos sales de hierro en proporciones definidas, de modo que el potencial de Nernst de la solución se

estableciera en un valor superior a $-0,6$ V. Luego, una inspección al diagrama de Pourbaix del Fe muestra que estas condiciones favorecen la formación de óxidos del metal (Fe_2O_3 , Fe_3O_4). Por otra parte, la agitación en un sistema abierto aseguró la formación homogénea y progresiva del precipitado de Fe_xO_y ; mientras que, el citrato de sodio y la gliadina desempeñaron su función como estabilizantes de las nanopartículas. Las Nps formadas, fueron separadas por centrifugación y redispersadas en una solución ligeramente ácida (a pH 6) para neutralizar el medio. Luego, para facilitar la dispersión de las Nps en la solución, se mezcló con etanol. Tras completar el resto de los pasos del procedimiento, relacionados con la separación y secado del sólido, se obtuvieron $246,9 (\pm 0,1)$ mg de un producto de color pardo. Cabe resaltar que, Lyon⁷², en el año de 2004, aplica un método de síntesis muy similar para la preparación de nanopartículas de óxido de hierro obteniendo una mezcla de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y de magnetita (Fe_3O_4).

3.3.1. Caracterización de las Nanopartículas de Fe_xO_y por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):

La microscopía electrónica de barrido se aplicó para obtener información acerca del tamaño y forma de las Nps. A continuación, se muestra las imágenes tomadas por MEB de las nanopartículas de óxido de hierro (soportadas en una placa de silicio):

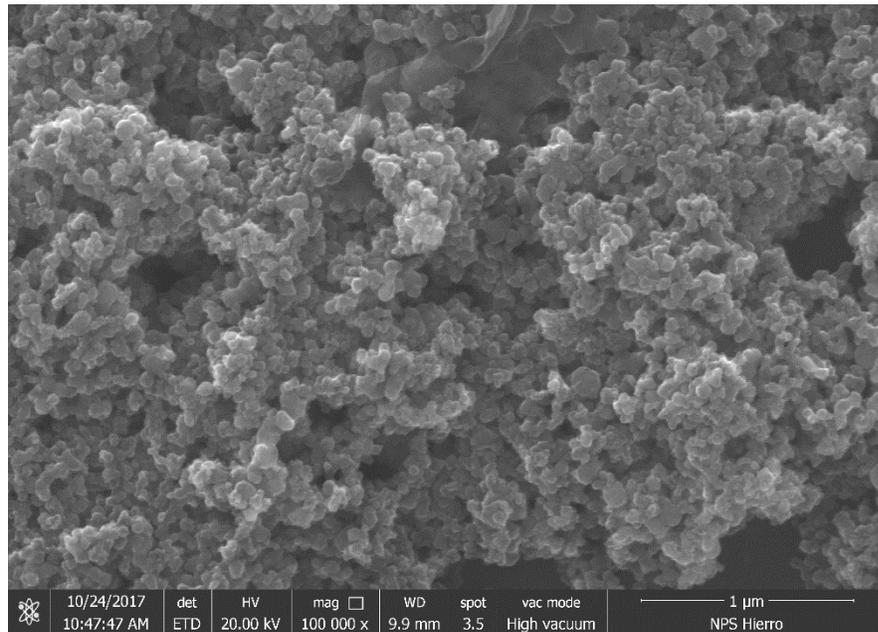


Figura 27. Micrografía de las partículas de Fe_xO_y , obtenida por MEB con una ampliación de 100 kx.

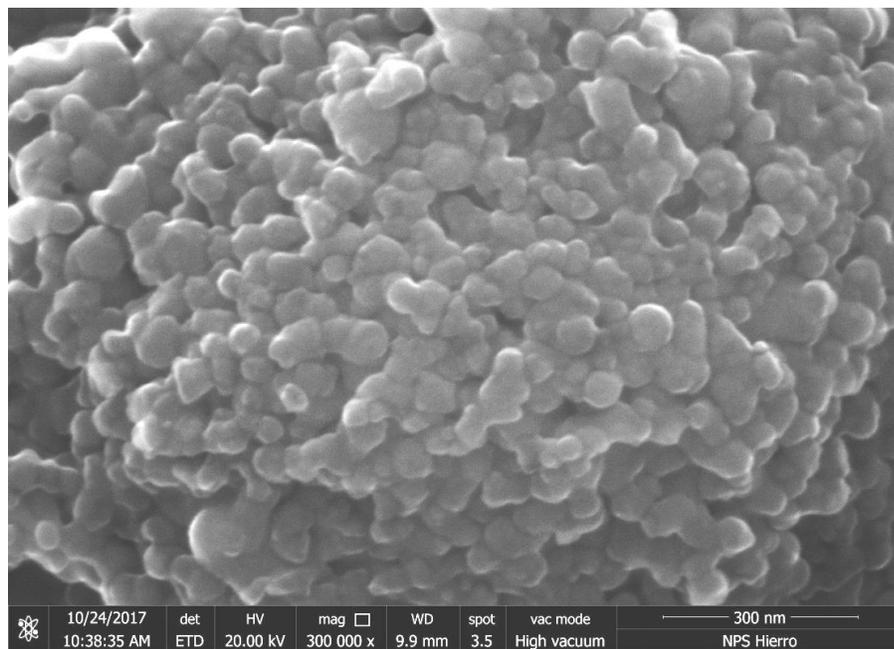


Figura 28. Micrografía de las partículas de Fe_xO_y , obtenida por MEB con una ampliación de 300 kx.

En las figuras anteriores, el sólido se visualiza como un conglomerado de partículas de formas esféricas. Éstas poseen un tamaño promedio de 76 nm (según mediciones elaboradas con el programa xT Microscope Server). Por su parte, el microanálisis elemental nos confirma la presencia de los elementos: Fe y O, en una relación atómica de 7:2; posiblemente porque la muestra está compuesta por la mezcla de los óxidos γ -Fe₂O₃ y magnetita Fe₃O₄.⁷² El Fe puede ser identificado en el espectro (Figura 29) por de los picos que corresponden a las líneas K α y L α , las cuales, poseen energías de 6400 keV y 704 eV, respectivamente. La señal K α del oxígeno se ha manifestado en zonas aledañas al valor de 0,523 keV. A continuación, se muestra el espectro junto a la tabla que reporta la composición de la muestra.

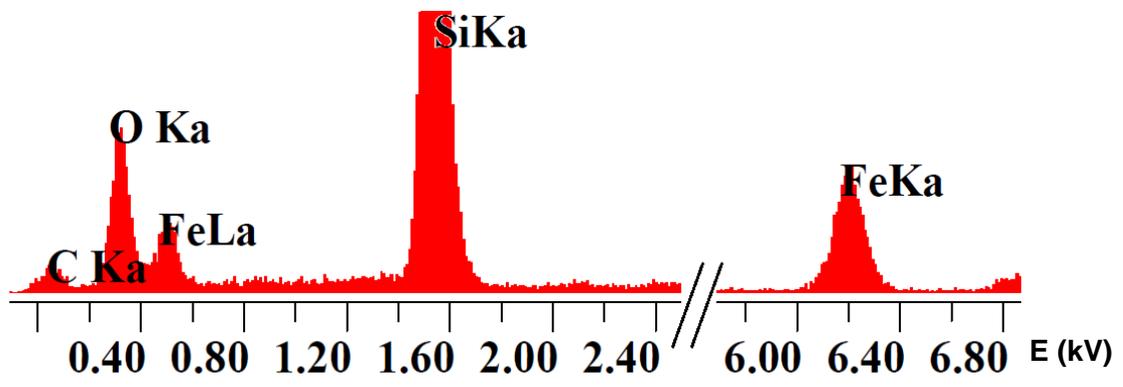


Figura 29. Espectro de las nanopartículas de óxido de hierro, obtenido por la técnica EDS.

La presencia de Carbono se debe posiblemente al estabilizante usado en la síntesis de las nanopartículas: Citrato de sodio.

3.3.2. Caracterización de las Nanopartículas de Fe_xO_y por DLS.

Previamente las suspensiones de las nanopartículas de Fe_xO_y fueron sonicadas durante 2 min en etanol. Las medidas de DLS consistieron en tres corridas de 20 s cada una, en las cuales se empleó un láser de longitud de onda (λ) de 658nm a un ángulo de detección (dispersión) de 90° . El medio de dispersión fue etanol (índice de refracción de 1,361 ; y viscosidad de 1,074 mPa·s a 20°C).

La *Figura 30* muestra el histograma de distribución de tamaños de la muestra de Fe_xO_y , en la que se observa una población de partículas nanométricas alrededor del valor de 15 nm. Se esperaba que el radio hidrodinámico de las Nps fuese mayor al tamaño obtenido por MEB; sin embargo, este resultado puede explicarse por la agregación de la Nps de Fe_xO_y fuera de solución debido a sus características magnéticas.

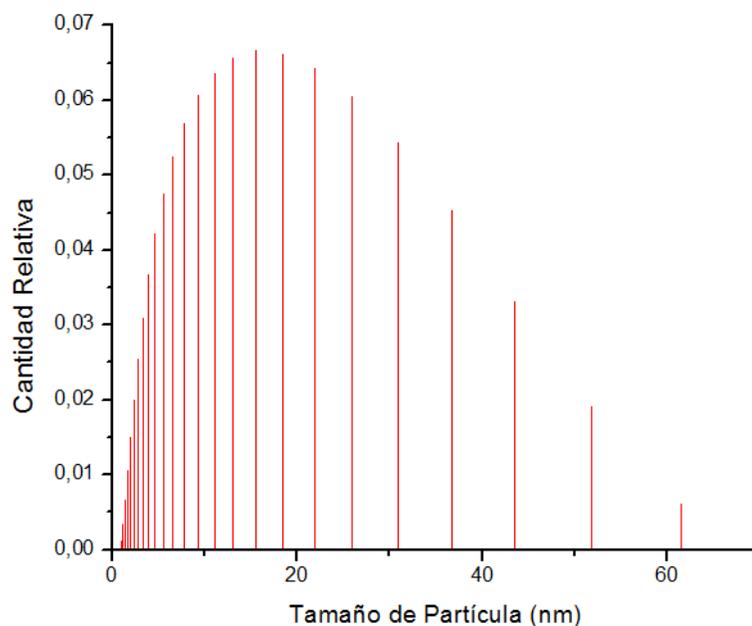


Figura 30. Histograma de Intensidades en función de la distribución de tamaño de las nanopartículas de Fe_xO_y .

3.3.3. Caracterización de las Nanopartículas de Fe_xO_y por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.

Las dispersiones de nanopartículas metálicas por lo general presentan bandas de absorción en la región UV-visible debido a la excitación de la resonancia de plasmón de superficie.⁵⁷ En este sentido, la *Figura 31* muestra el espectro UV-VIS de una dispersión, en agua y a 28°C, de las nanopartículas de Fe_xO_y sintetizadas. En el espectro resalta una ancha banda de absorción que parece estar compuesto por la superposición de dos picos; así que, mediante el programa OriginPro 8,5, se ha logrado la deconvolución del espectro, de manera que, uno de los picos (verde) alcanza su máximo a una longitud de onda de 362 nm; el otro (azul) por su parte, tiene su máximo en una región fuera del límite de detección del detector. Este resultado está acorde con trabajos previos que han caracterizado nanopartículas de óxido de hierro mediante espectroscopía UV-visible, pues según las condiciones del medio y factores asociados al tamaño de las partículas, el estabilizante, entre otro, el pico se puede ubicar entre 200 y 400 nm^{71, 73-75}

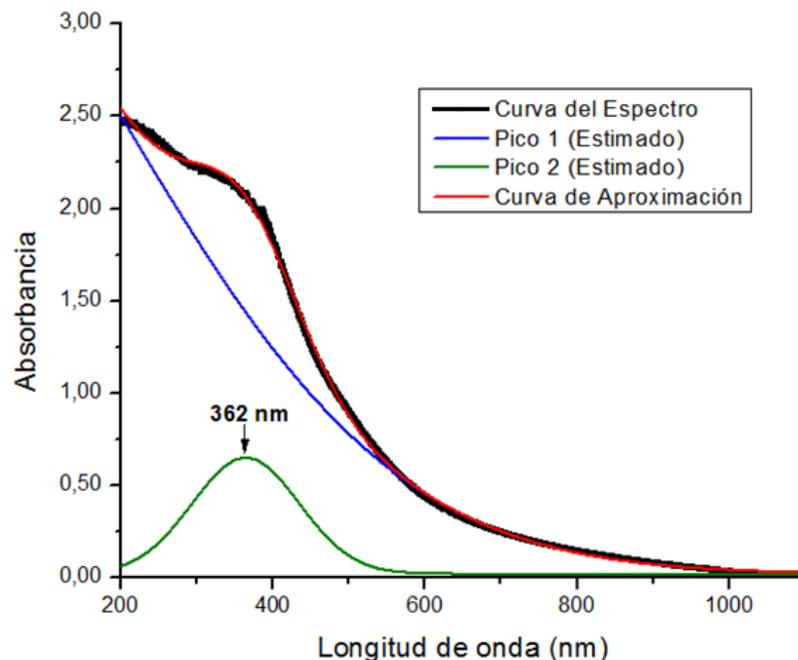


Figura 31. Espectro UV-VIS de una dispersión de Nps Fe_xO_y en agua, a 28°C.

3.4. Análisis del método de síntesis de las nanopartículas de Cobre.

En este proyecto, las nanopartículas de cobre se sintetizaron vía electroquímica empleando electrolisis a densidad de corriente constante. En este sentido, se llevó a cabo la reacción de oxidación de Cu a Cu⁺², en el ánodo; mientras tanto, en el cátodo ocurría la reducción de los iones Cu⁺² a Cu, que formaría a las Nps, según la semirreacción:



En la ruta de síntesis, se empleó al ácido ascórbico y a la gliadina como agentes estabilizadores. Sin embargo, el primero de los mencionados cumplió una función adicional: prevenir la oxidación de las nacientes nanopartículas de Cu.⁷⁶ Finalmente, sólo se obtuvo 50(±1) mg de producto.

3.4.1. Caracterización de las Nanopartículas de Fe_xO_y por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de energía de Rayos X (EDS):

La micrografía de la muestra de Cu (*Figura 32*), la cual está soportada sobre una placa de silicio, revela que el tamaño de partícula está en el orden de las micras; muy grande para tratarse de Nps.

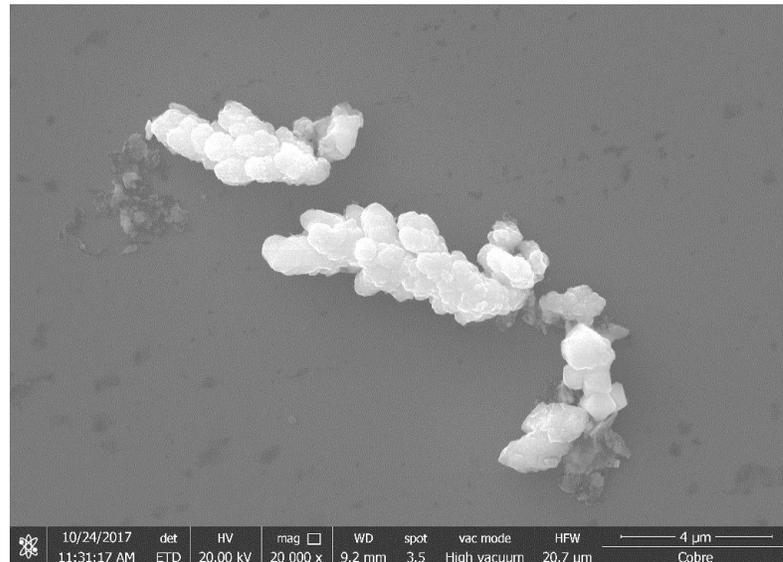


Figura 32. Micrografía de las partículas de cobre, obtenida por MEB

En la *Figura 33*, se registran dos señales pertenecientes al espectro EDS característico del Cu; las cuales están asociadas a las transiciones energéticas 8,041 keV ($K\alpha$) y 0,928 keV ($L\alpha$). El microanálisis elemental revela que las partículas contienen oxígeno; en una relación atómica Cobre/oxígeno de 20:13 (esto puede justificarse debido a la presencia de una mezcla óxidos de cobre CuO , Cu_2O). De igual manera se detecta la presencia de carbono; en este caso, por causa del ácido ascórbico usado durante la síntesis.

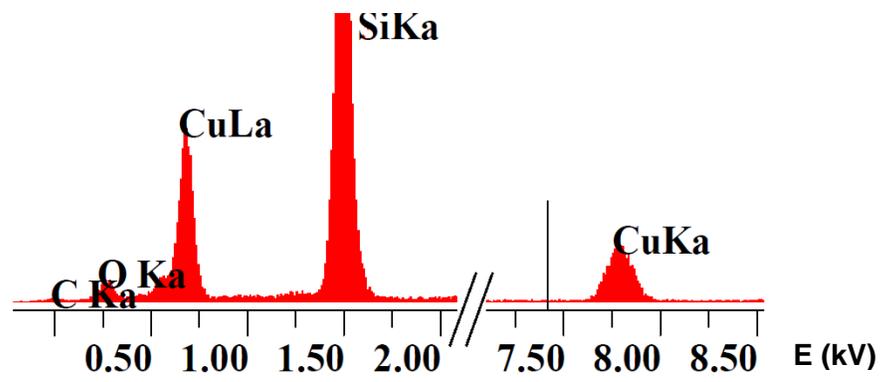


Figura 33. Espectro de las partículas de Cobre, obtenido por EDS.

3.4.2. Caracterización de Nps Cu por DLS

La muestra de Cobre fue sometida a las mismas condiciones de preparación para la caracterización de Fe_xO_y por DLS. Por su parte, los resultados del histograma de distribución de tamaños (*Figura 34*) estuvieron acordes con aquellos que fueron obtenidos por MEB: el tamaño de las partículas no es del orden de los nanómetros; de hecho, la población de éstas se distribuyó alrededor de las 15 μm , en el rango comprendido entre 0,5 μm y 10 μm . En consecuencia, se puede afirmar que, el método aplicado para la síntesis de nanopartículas de Cu no resultó ser eficaz en su propósito.

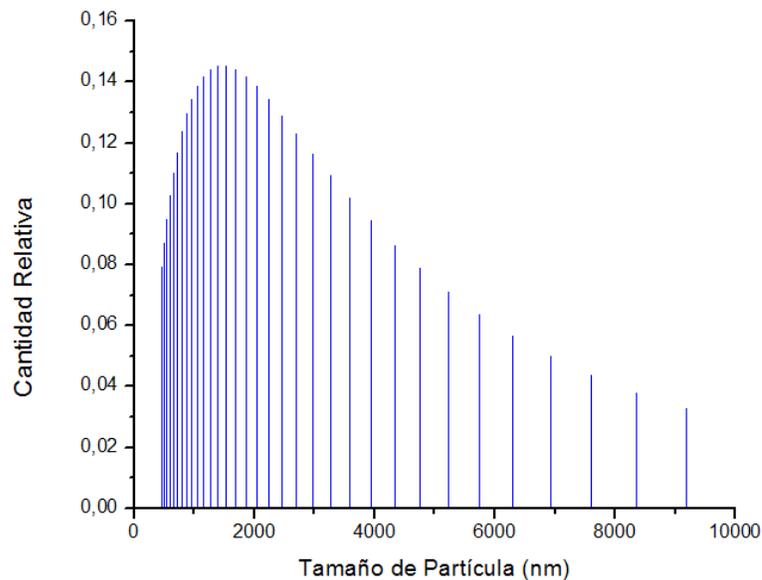


Figura 34. Histograma de Intensidades en función de la distribución de tamaño de las partículas de Cobre

3.4.3. Caracterización de las Nanopartículas de Cu por Espectroscopía de Absorción UV-Visible.

Debido al tamaño de las partículas (del orden de las micras) no se observó el fenómeno de resonancia de plasmón superficial en el espectro de absorción UV-visible de una dispersión del sólido en agua (*Figura 35*), cuya banda de SPR se presenta a

longitudes de onda entre 520-580 nm, según lo reportado en otras bibliografías.⁷⁷ Por su parte, en el espectro parece estar presente dos pequeños picos, a 280 nm y 360 nm, que no están identificados ni asignados en la bibliografía.

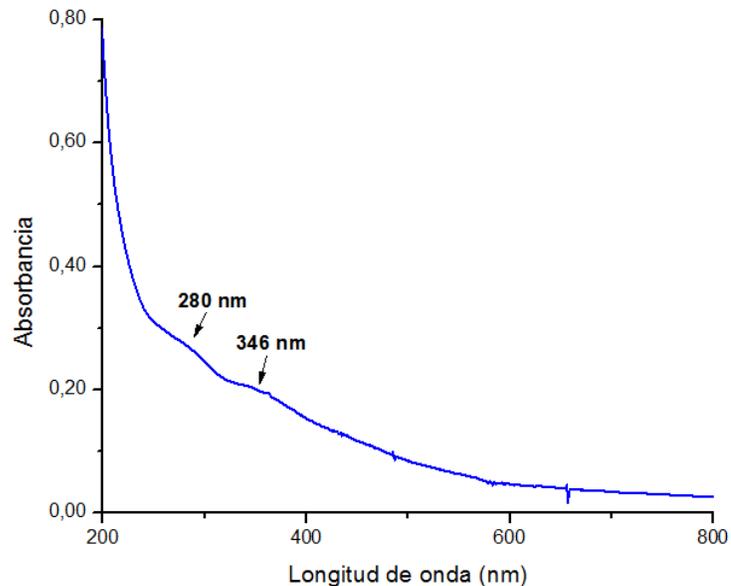


Figura 35. Espectro UV-VIS de una dispersión de partículas de Cobre en agua, a 28°C.

3.5. Análisis de la Preparación de los Electrodo de Trabajo.

Para la modificación de la superficie de los electrodos se utilizó un método sencillo y práctico, de aplicación común en el desarrollo de muchos sensores.^{37,78,79} depositar una gota de agente modificante en la cara del electrodo y permitirle secar a temperatura ambiente durante algunas horas. Luego, la caracterización de los electrodos se realizó mediante métodos electroquímicos y a través de microscopía electrónica de barrido (MEB).

3.5.1. Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS):

La microscopía electrónica de barrido se utilizó con la finalidad de estudiar la morfología de la superficie de los distintos electrodos. Además, gracias al detector del tipo EDS acoplado al microscopio, fue posible efectuar un microanálisis elemental que permitió la identificación de los agentes modificantes depositados en la superficie.

3.5.1.1. Electrodo de Grafito (G):

El electrodo de grafito constituye el sustrato sobre el cual se depositaron los distintos agentes modificantes de cada uno de los electrodos construidos, y por eso la importancia de conocer su morfología, previo a la deposición de éstos. Ahora bien, se observa que, a pesar del procedimiento de pulido al que fueron sometidos dichos electrodos de grafito, aun se aprecian en la *Figura 36* y *Figura 37*, la existencia de algunas discontinuidades y/o imperfecciones en la superficie de éstos.

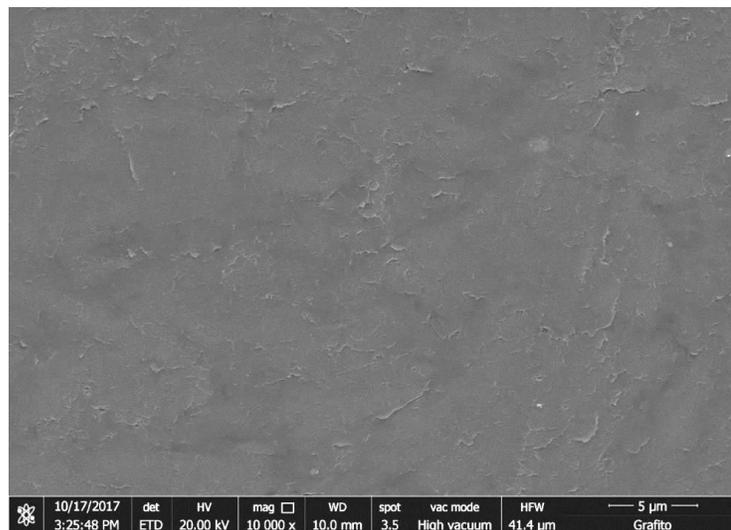


Figura 36. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito, obtenida por MEB con un aumento de 10 kx

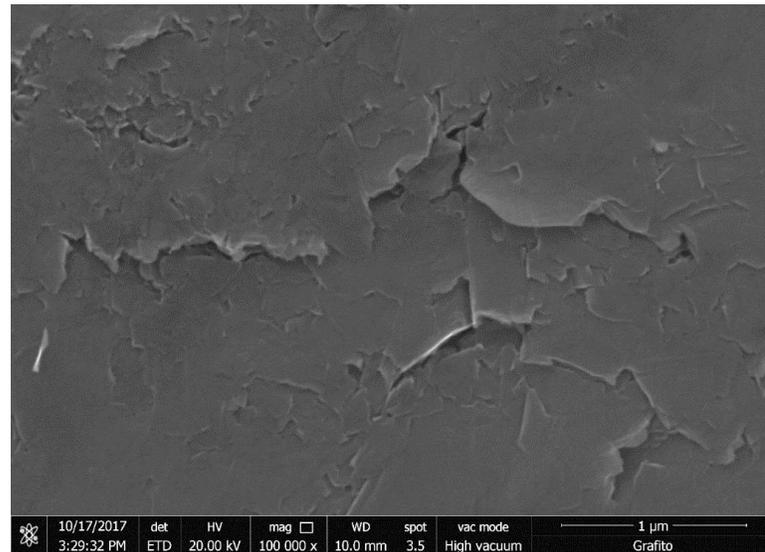


Figura 37. Micrografía de la superficie de electrodo de grafito, obtenida por MEB con un aumento de 20kx

Un espectro EDS (ver *Figura 38*) ha permitido conocer la composición elemental de la superficie de este electrodo: (a) un 98,5% de carbono y (b) un 1,5% de oxígeno. Esta información resulta relevante para evaluar el grado de pureza de la superficie y verificar la eficacia del lavado al cual fue sometido el electrodo al momento de su preparación.

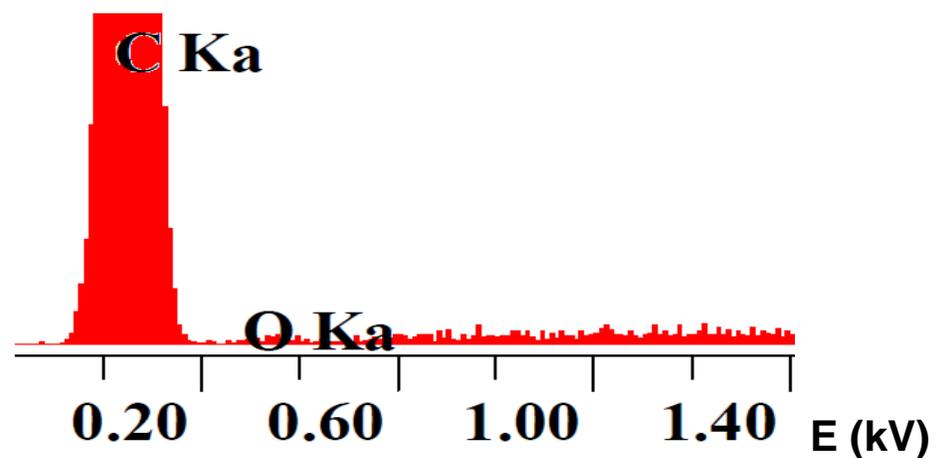


Figura 38. Espectro de la superficie del electrodo de grafito, obtenido por EDS.

3.5.1.2. Electrodo de Grafito modificado con Óxido de Grafeno (GO).

A continuación se muestran las imágenes de la superficie del electrodo G/GO obtenidas a través de MEB:

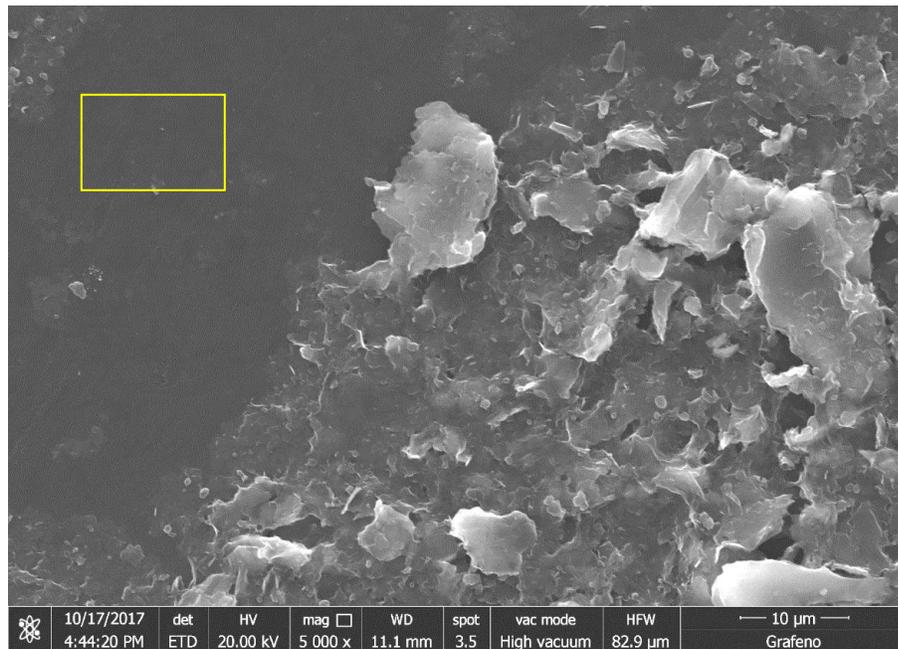


Figura 39. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno, obtenida por MEB. En amarillo se ha señalado una zona desprovista del agente modificante.

La figura anterior muestra al óxido de grafeno como un sólido en forma de hojuelas. Para confirmar la composición elemental del GO presente, se procedió entonces a la caracterización usando EDS, a través de un análisis multipunto, que consiste en la obtención del espectro en diversas zonas locales o puntuales de la imagen anterior. Uno de los espectros obtenidos más representativos, se muestra a continuación:

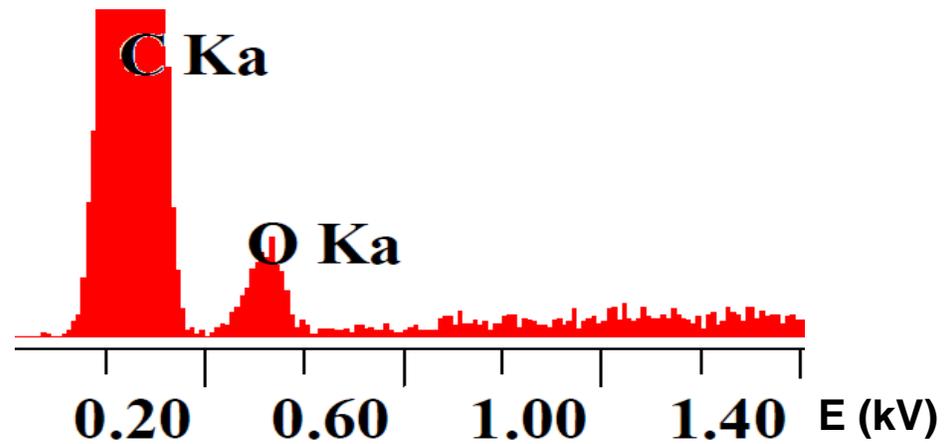


Figura 40. Espectro de la superficie del electrodo de grafito modificado con GO, obtenido por EDS.

Los datos promedio del porcentaje de los elementos detectados en el espectro anterior fueron: (a) 81 % de carbono y (b) 19% de oxígeno. Por otra parte, en la imagen de la *Figura 39*, existe una zona del sustrato (enmarcada en amarillo) desprovista del recubrimiento de GO; lo cual implica que la deposición de la capa de GO en el electrodo no resultó ser homogénea, mediante el método de preparación aplicado.

3.5.1.3. Electrodo de Grafito modificado con Óxido de Grafeno y partículas de Cobre (GO/Cu).

En la micrografía siguiente, se visualiza la superficie del electrodo de GO/Cu. El GO se puede reconocer fácilmente por su estructura laminar. Por otra parte, se observan algunas partículas brillantes dispersas a lo largo de la superficie. El microanálisis elemental de una de éstas (señalada en la imagen por un círculo) ha confirmado la presencia de cobre. El espectro de esta partícula de cobre se muestra en la *Figura 42*.

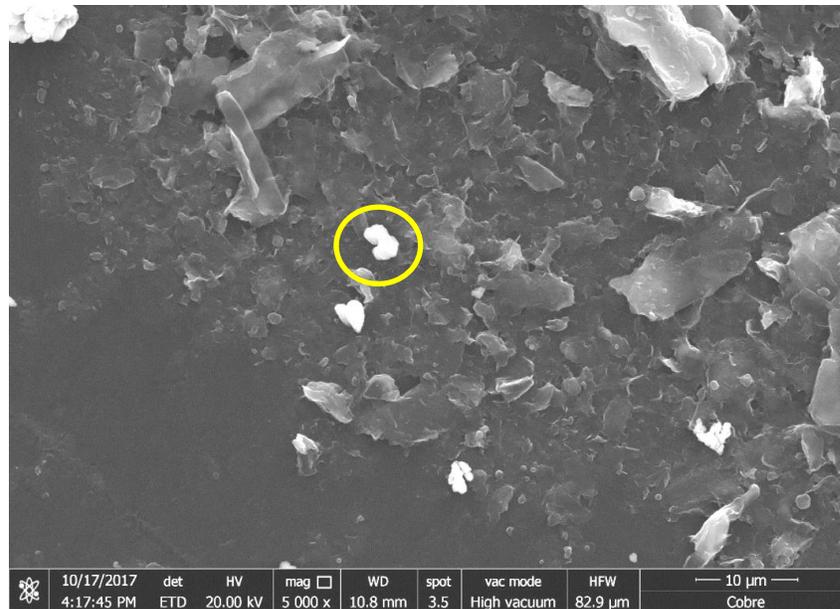


Figura 41. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y partículas de cobre, obtenida por MEB. En un círculo amarillo se ha delimitado a una de las partículas de Cobre.

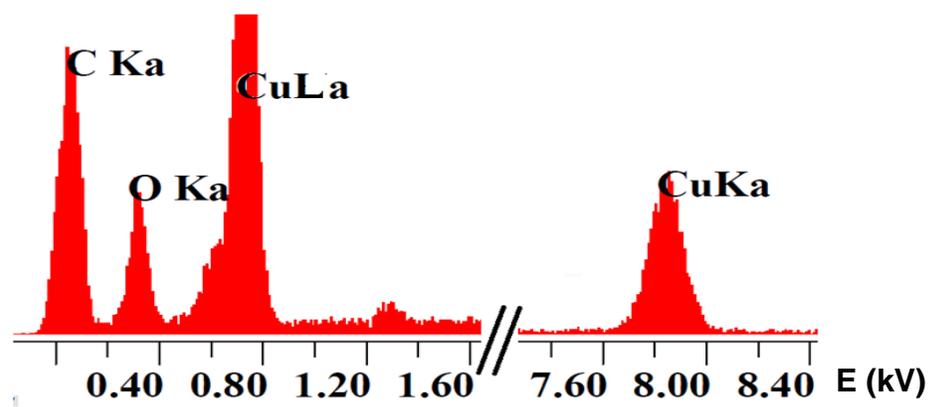


Figura 42. Espectro EDS de la partícula de cobre señalada en la Figura 4.

3.5.1.4. Electrodo de Grafito modificado con Óxido de Grafeno y NpsFe_xO_y (GO/Fe).

La imagen de la superficie del electrodo de GO/Fe se muestra a continuación. En la zona enmarcada con color amarillo, se confirmó gracias al espectro EDS (ver *Figura 44*) la presencia de hierro, lo cual es un indicativo de las nanopartículas de óxido de hierro depositadas sobre las láminas de GO.

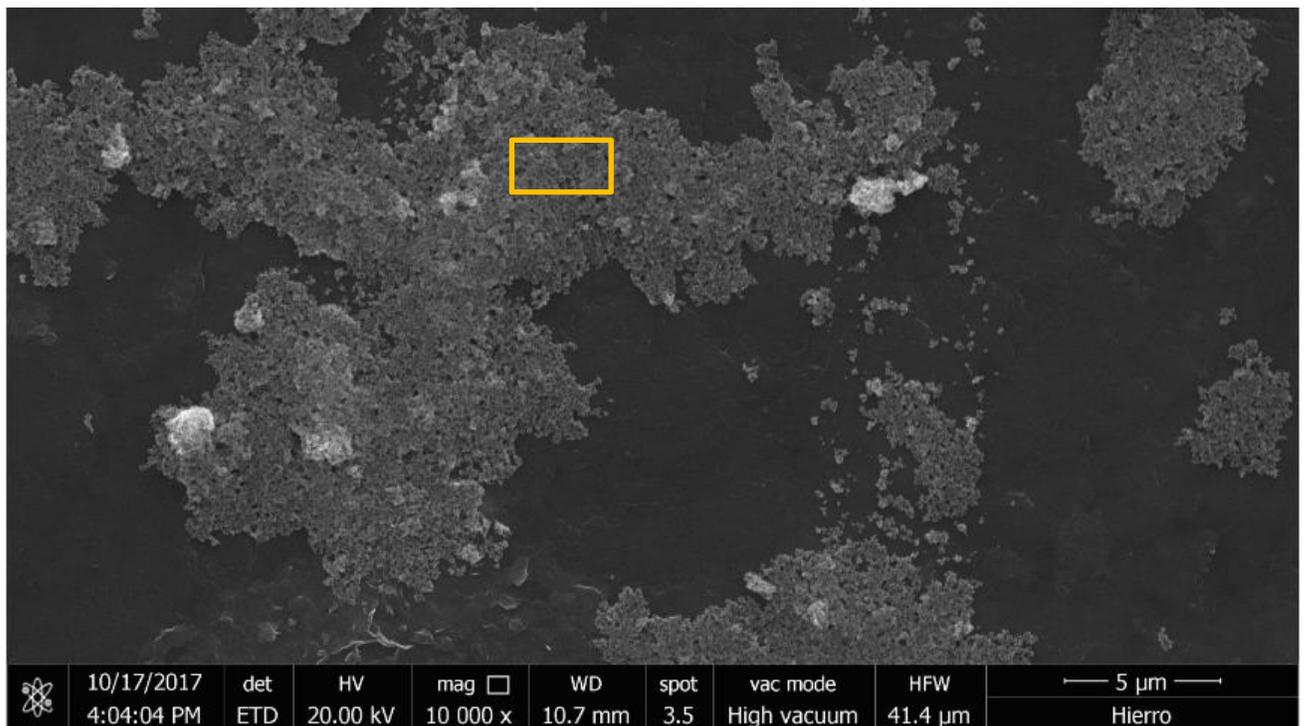


Figura 43. Micrografía de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y NpsFe_xO_y , obtenida por MEB

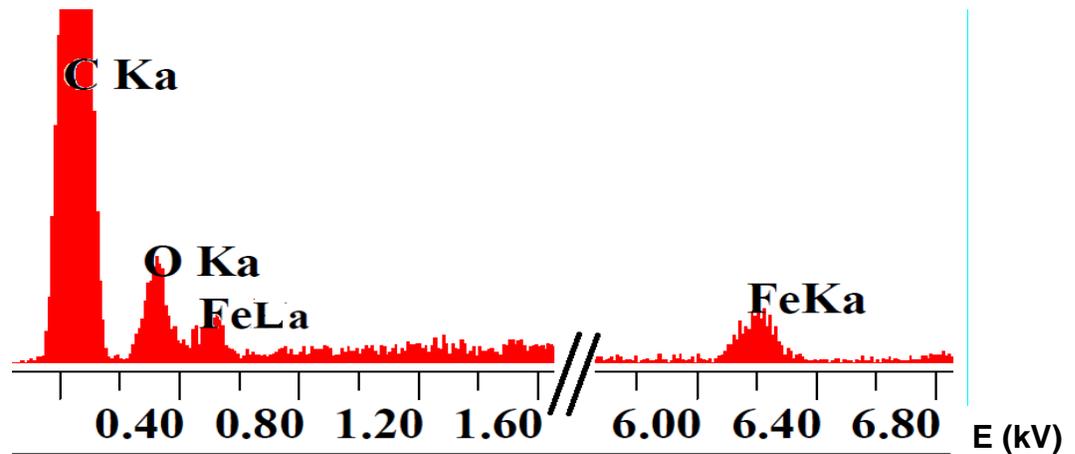


Figura 44. Espectro EDS de la superficie del electrodo de grafito GO/Fe en la zona enmarcada en la Figura 43

En la micrografía de la *Figura 43*, tal como se observó en las anteriores, la capa del agente modificante no se depositó uniformemente a lo largo del sustrato (grafito). Este hecho, como podrá verse más adelante en la sección 3.7.1 pudiera ser un factor importante a considerar que habría afectado la precisión de las mediciones electroquímicas para la detección de gliadina.

3.5.1.5. Electrodo de Grafito modificado con Óxido de Grafeno y $NpsFe_xO_y$ (GO/Fe), después de las mediciones de Gliadina.

En la sección 3.6 se podrá corroborar que el electrodo de trabajo con mayor aplicabilidad en la detección de gliadina fue el de GO/Fe; y por ello, se procedió a estudiar la superficie de uno de estos electrodos tras su utilización como sensor en las correspondientes pruebas electroquímicas.

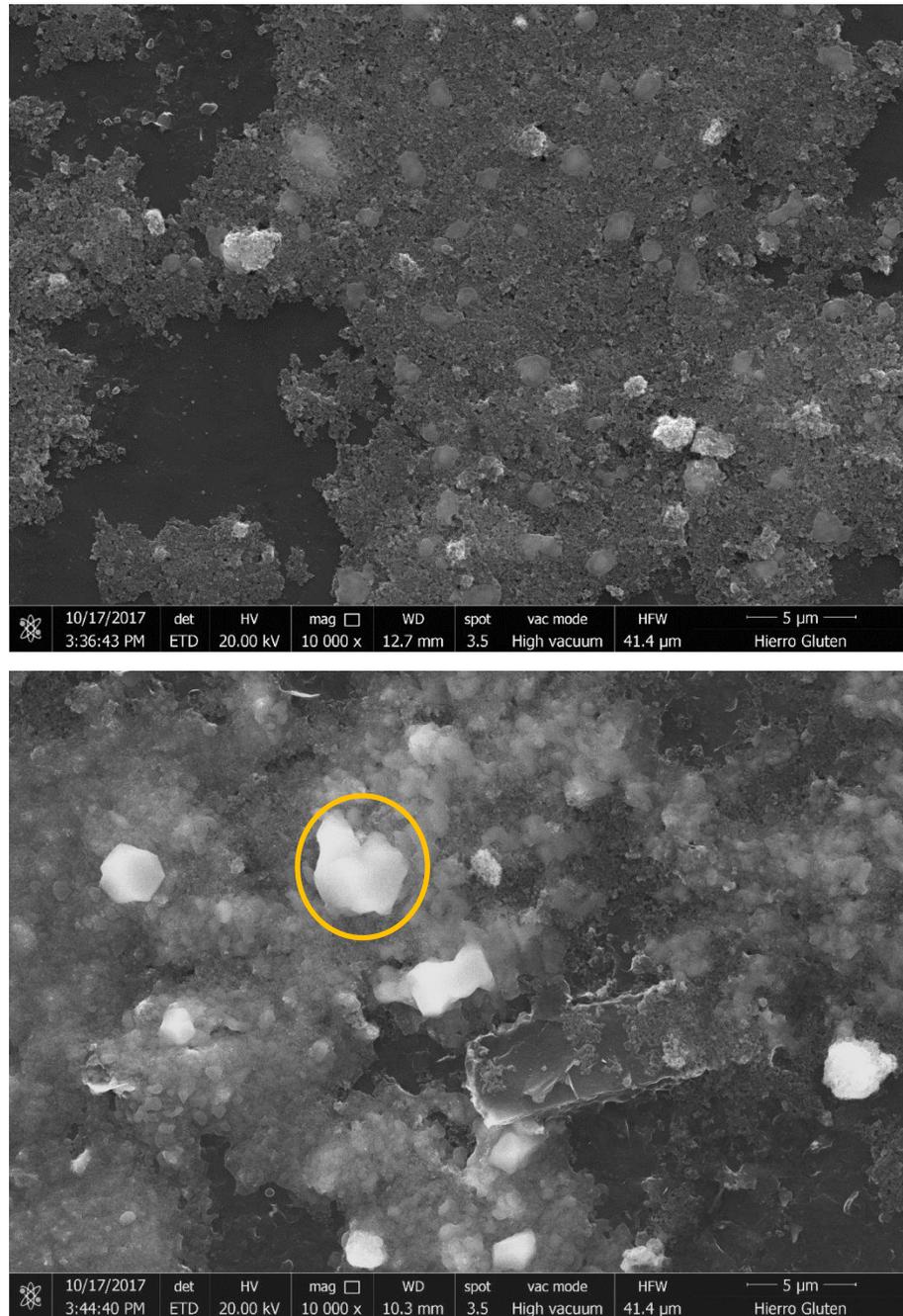


Figura 45. Micrografías de la superficie de un electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno y NpsFe_xO_y tras su utilización como sensor de Gliadina. El círculo amarillo delimita un cristal de KCl.

Las partículas brillantes en las micrografías anteriores muestran facetas propias de los cristales, de hecho, el análisis elemental reveló la presencia de los elementos Potasio y Cloro; de modo que, dichas partículas pueden atribuirse a cristales de KCl, cuya presencia se justifica debido a que esta sal fue utilizada como electrolito de soporte en las mediciones electroquímicas. A continuación, el espectro de uno de los cristales:

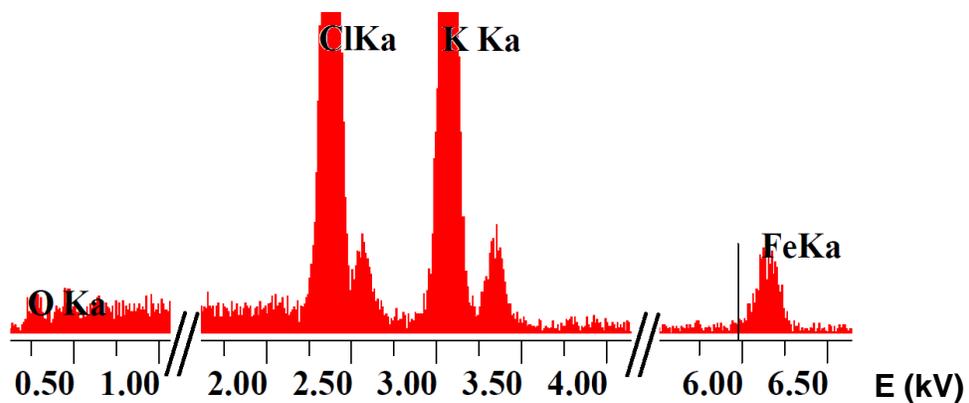


Figura 46. Espectro EDS de un cristal de KCl localizado en la superficie del *electrodo de grafito GO/Fe* (tras la detección de Gliadina).

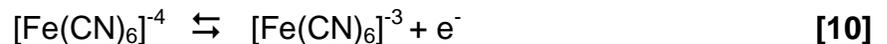
Es importante señalar que el análisis elemental realizado en distintas zonas de la muestra, no detectó la presencia de Nitrógeno, a pesar de que la gliadina, el $K_4[Fe(CN)_6]$ y el $K_3[Fe(CN)_6]$ contienen este elemento. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el porcentaje de N presente en la superficie se encuentre por debajo del límite de detección de resolución elemental del EDS (que es del orden del 0,1%). Debe acotarse que los dos últimos compuestos (las sales de ferrocianuro y ferricianuro de potasio) se encontraban presentes en solución dentro de la celda electroquímica de medida. Entonces, puede que el lavado al cual se sometía el electrodo después de cada medida, haya sido eficiente en para retirar estos complejos de la superficie del electrodo.

3.5.2. Caracterización de electrodos por Voltamperometría Cíclica (VC).

3.5.2.1. Sistema de referencia.

Se utilizó un alambre de Ag como electrodo de pseudoreferencia. Las ventajas del uso de electrodos de pseudo referencia son su simplicidad, y debido a que están inmersos directamente en el electrolito (utilizado en la celda), el efecto de resistencia óhmica (impedancia) es pequeño, no aparece el potencial de unión líquida, y generalmente no hay contaminación de la solución de prueba por moléculas de solvente o iones que un electrodo de referencia convencional podría transferir. Para calibrar este electrodo, se debe establecer una potencial de referencia respecto al cual reportar los datos obtenidos, y es por ello que se procedió a determinar el valor del potencial formal del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ en cada determinación mediante voltamperometría cíclica.

El voltamperograma que se muestra en la *Figura 47*, se obtuvo para un electrodo de grafito sin modificar, y muestra una ventana de trabajo comprendida entre -0,8 V y 1,1 V. Partiendo de un potencial de corriente nula y en dirección anódica, se observó una onda de oxidación a 0,227 V. Luego, en el sentido opuesto del barrido de potencial, se observa una señal de reducción, cuyo pico está ubicado en 0,180 V. El promedio de estos potenciales de pico es de 0,204 V y representa al potencial del par ferrocianuro-ferricianuro, a una temperatura de 28°C, cuya ecuación química es la siguiente:



Ahora bien, si a cada valor de potencial medido por el equipo, se le sustrae los 0,204 V del potencial formal de la reacción [10]; entonces, se ha conseguido reportar los datos de cada medida, respecto al potencial de reducción del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$.

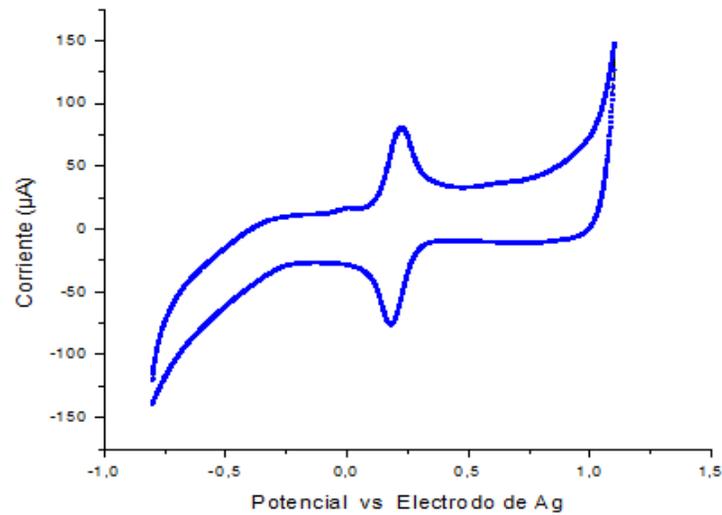


Figura 47. Voltamperograma cíclico de una solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM), $K_3[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM) y KCl (al 1,00 M). Las mediciones fueron obtenidas usando un electrodo de grafito sin modificar a una velocidad de barrido de 100 mV/s y respecto al electrodo de pseudoreferencia de Ag.

A continuación se exhibe el voltamperograma resultante después de aplicar este procedimiento:

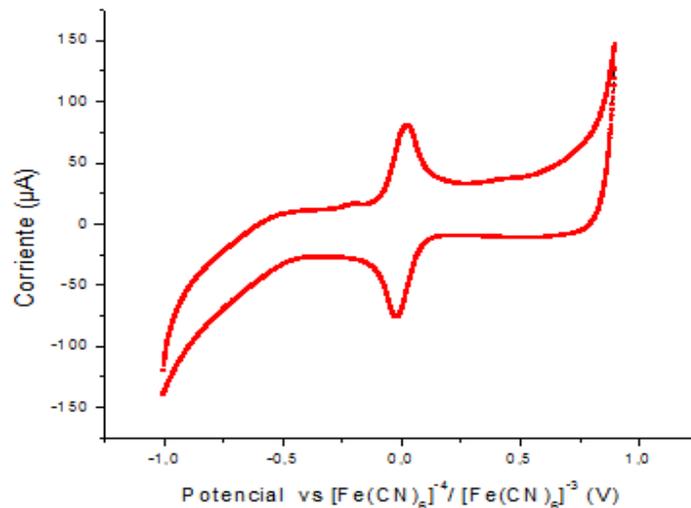


Figura 48. Voltamperograma cíclico de una solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM), $K_3[Fe(CN)_6]$ (al 1,0 mM) y KCl (al 1,00 M). Las mediciones fueron obtenidas usando un electrodo de grafito sin modificar, a una velocidad de barrido de 100 mV/s y respecto al potencial formal de la reacción redox del par $[Fe(CN)_6]^{4-} / [Fe(CN)_6]^{3-}$

A partir de este punto, todos los datos reportados en el trabajo, producto de mediciones electroquímicas, presentan esta corrección en el potencial.

Cabe decir que, la elección del potencial de la reacción redox del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como referencia, se justifica por dos razones: (1) Ambos iones son bastante estables frente a cambios de pH, presencia de oxígeno, y otras especies que pudieran estar presentes en el medio; por ende, estas características hacen del potencial de la reacción un parámetro útil para definirlo como referencia.⁸⁰ (2) Como el sensor a desarrollar, detecta indirectamente la gliadina a través de la inhibición de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, se requiere entonces que estos iones se encuentren presentes todo el tiempo en la solución; de modo que será posible determinar el potencial de referencia en cualquier momento.

4.5.2.2. Electrodo de Trabajo

Para los cuatro diferentes electrodos de trabajo se obtuvo su correspondiente voltamperograma cíclico en (a) una solución acuosa de KCl 1,00 M y en (b) una solución equimolar 1,0 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en KCl 1,00 M (solución **A**). Esta acción tenía como objeto: evaluar el comportamiento electroquímico de los electrodos en el medio de reacción, ante la ausencia del analito (gliadina).

A continuación se anexan todos los voltamperogramas:

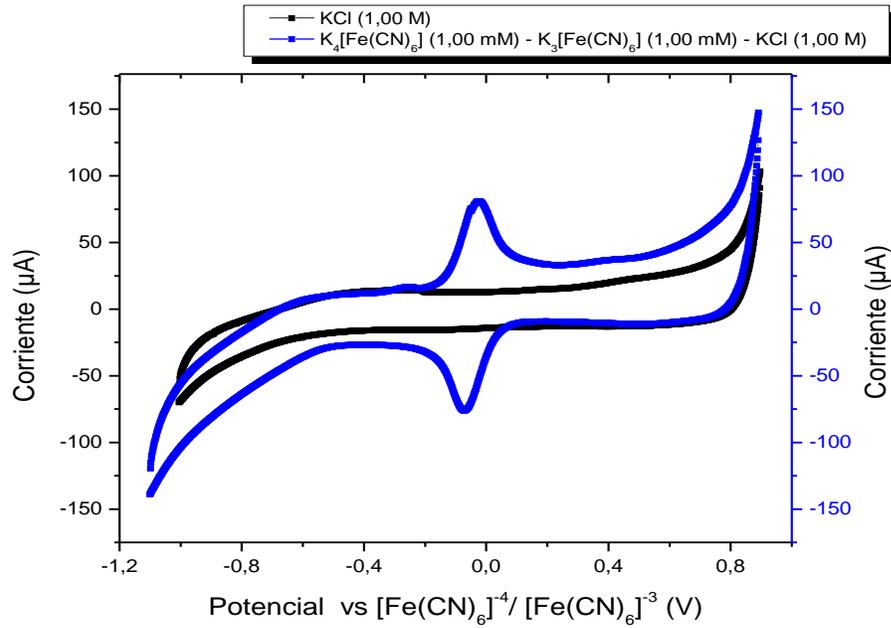


Figura 49. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito sin modificar en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.

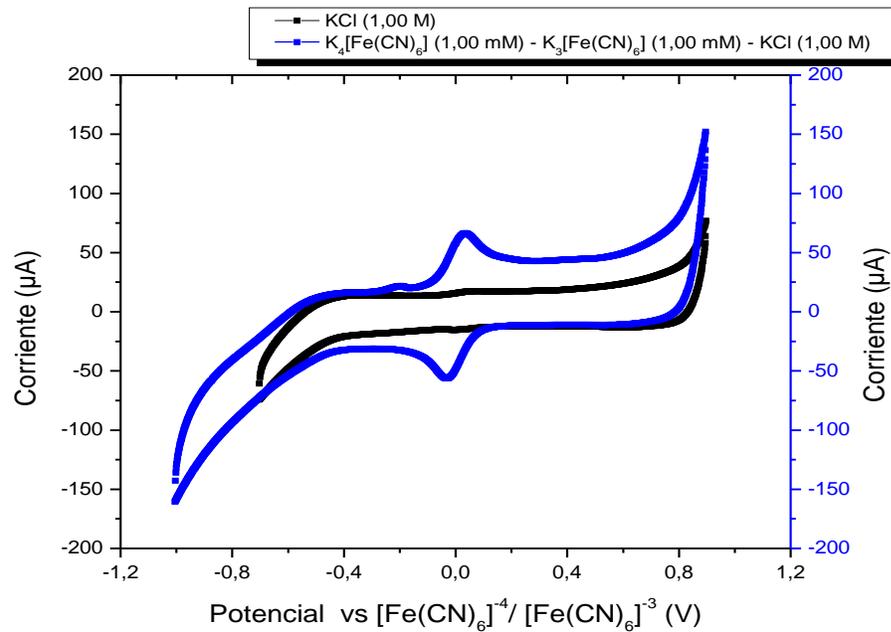


Figura 50. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con óxido de grafeno (GO) en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.

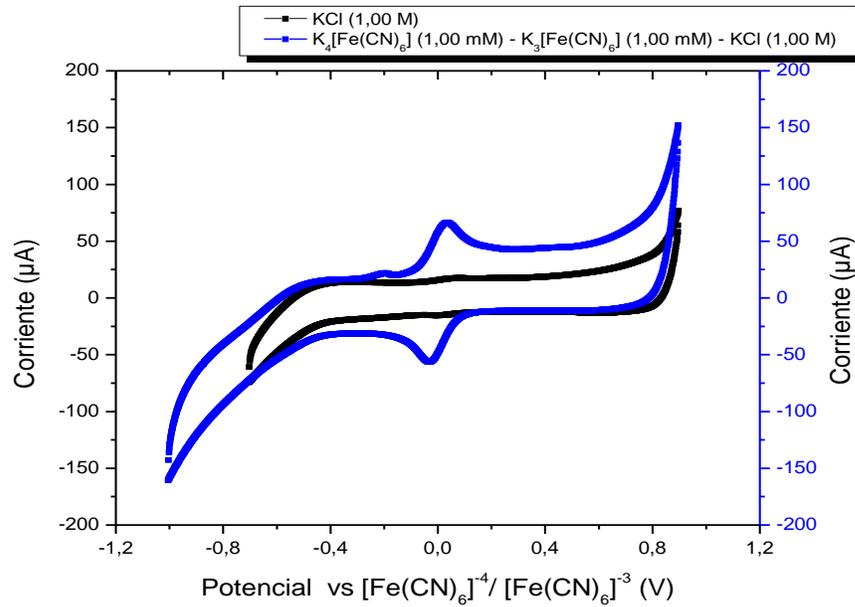


Figura 51. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con GO y Nps Fe_xO_y (GO/Fe) en (a) una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.

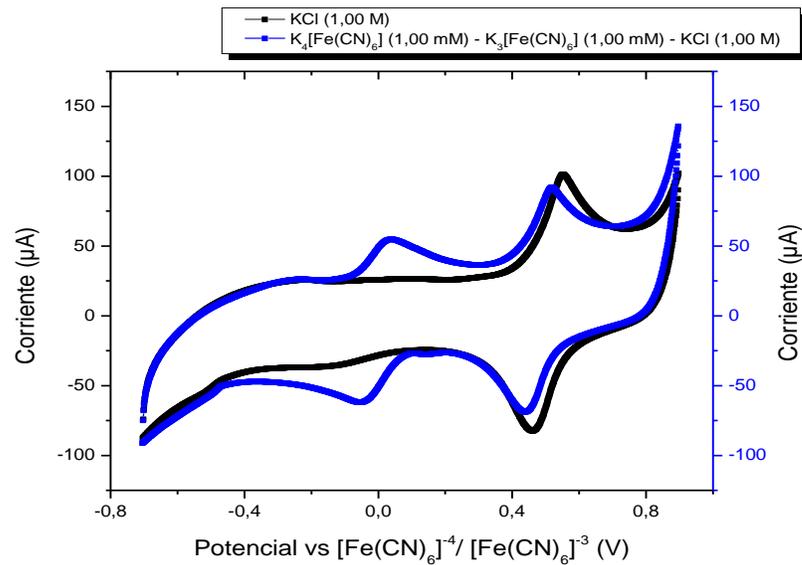
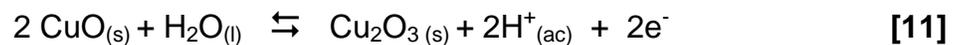


Figura 52. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de grafito modificado con GO y partículas de Cu (GO/Cu) en (a) una solución una solución de KCl 1,00 M y (b) en solución A; a 100 mV/s.

Los picos característicos de los voltamperogramas cíclicos son ocasionados por la formación de una capa de difusión cerca de la superficie del electrodo. Durante el barrido directo, el conjunto de moléculas de ferrocianuro cercanas a la superficie del electrodo, se reducen para generar el pico anódico; por su parte, en el barrido inverso, las moléculas de ferricianuro que son reducida generan un pico catódico es el resultado. Este fenómeno puede ser descrito mediante la ecuación de Buttler-Volmer. Por otra parte, la banda gruesa que caracteriza a todos los voltamperogramas es debido a efectos capacitivos producto de la gran área superficial del grafeno.

En los voltamperogramas obtenidos en KCl 1,00 M, no se detectó ninguna señal para los electrodos G, GO y GO/Fe; en tanto que, para el electrodo GO/Cu se observó una onda anódica y otra catódica, ubicadas respectivamente en los potenciales 0,552 V y 0,460 V. Este resultado es un indicativo de la actividad electroquímica de las partículas de Cobre en la ventana de potencial aplicada. De hecho, el alto valor del potencial formal (calculado en 0,506 V vs $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$), sólo puede ser explicado a través del paso de Cu^{II} a Cu^{III} en el sistema, por ejemplo, a través de la reacción:



La redox de conjunto $\text{Cu}^{\text{II}} / \text{Cu}^{\text{III}}$ está reportada en la bibliografía. De hecho, el paso de Cu^{II} a Cu^{III} se encuentra estabilizado en ciertas fases⁸¹; además, se encuentra implicado en reacciones catalíticas que implican la oxidación de glucosa.^{40,82}

En lo que respecta a la *solución A*, la voltamperometría cíclica se realizó en una ventana de potencial de -1,1 V a 0,8 V. Todos los voltamperogramas (independientemente del electrodo de trabajo utilizado) registraron dos señales: un pico de oxidación y otro de reducción, producto de la reacción redox asociada al par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$, cuyo potencial formal oscila alrededor de los 0 V. Para el caso del electrodo

de GO/Cu nuevamente se detectaron las señales correspondientes al proceso redox que involucra al conjunto $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}$

Por otra parte, Finalizada la caracterización de la *solución blanco*, a través de la identificación de todas las señales de las especies que presentan actividad electroquímica en la ventana de potencial aplicada, se prosigue con el estudio del procedimiento utilizado para la detección del analito (gliadina).

3.6. Detección de gliadina mediante voltamperometría de onda cuadrada.

Se propuso utilizar la voltamperometría de onda cuadrada debido a: (a) su eficiencia para observar señales faradicas y la disminución de ruido. (b) La rapidez del proceso de medición, respecto a otras técnicas, como por ejemplo la voltametría de pulso diferencial. De hecho, en nuestro proyecto, cada medición tardó 3 min, en promedio. (c) Presenta una alta sensibilidad, y es útil para la medición de especies orgánicas a niveles de trazas, pudiendo alcanzarse límites de detección del orden de los 10^{-8} M. ⁴⁵

3.6.1. Optimización de la señal de oxidación del par electroactivo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Los voltamperogramas cíclicos de las *Figuras 49-52* permitieron establecer la mejor ventana de trabajo para acotar la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ desde -0.3875 V hasta $0,3625$ V. Luego, al aplicar la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) se realizó un barrido en sentido anódico en los límites de dicho rango; al tiempo que, se llevó a cabo una optimización puntual de los parámetros: altura de paso de $4,5$ mV; frecuencia de 10 Hz; y una amplitud de la onda cuadrada de $49,95$ mV; los cuales, permitieron obtener la onda de oxidación mejor definida para el par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Por otra parte, resulta importante tratar algunas generalidades de la parte experimental, que también estuvieron asociadas a la optimización de las medidas. Para comenzar, la adición de gliadina se realizó, de manera *ex situ*, sobre la superficie del electrodo. Éste era sumergido unos 3 min en la solución de la celda electroquímica; para luego, ser extraído de manera cuidadosa, por encima del nivel de la solución y así generar un acceso capilar que permitió que sólo la cara modificada del electrodo estuviera en contacto con la solución. Con este procedimiento se logró obtener señales reproducibles en la zona anódica; pues se disminuyen los efectos asociados a la estructura 3D del grafito, y la capilaridad de la solución sobre el grafito.

Tras la optimización de todos estos factores, se midió la señal de oxidación del conjunto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ usando un electrodo de grafito (G) como electrodo de trabajo, en 3 ml de *solución blanco*. Los voltamperogramas obtenidos para la medición de 8 réplicas, se muestran en la *Figura 53*; a partir de los cuales se registró un valor de corriente de pico (I_{pa}) igual a $(57,1 \pm 0,9) \mu\text{A}$ (con una DER=1,6%). Cabe resaltar, que todos los valores de I_{pa} fueron medidos respecto a la línea base de la señal, utilizando el *programa Gpes*.

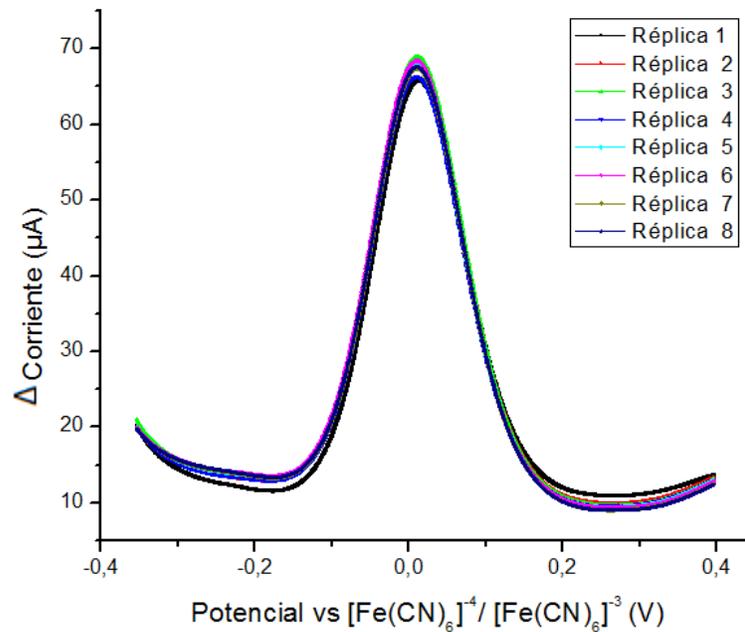


Figura 53. Réplicas de la señal de oxidación obtenidas mediante voltamperometría de onda cuadrada, para la reacción redox del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ de la solución A usando un electrodo de grafito.

3.6.2. Respuesta de los electrodos de trabajo en presencia de la gliadina.

Se procedió a evaluar la posible detección de gliadina con los diferentes electrodos, mediante voltamperometría de onda cuadrada. La adición de gliadina se realizó de manera *ex situ* sobre la superficie del electrodo de trabajo. Previo a esto, se había determinado la I_{pa} de la solución **A**. De esta manera, bajo las mismas condiciones de VOC reportadas en la sección anterior, se procedió a obtener el voltamperograma de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Luego, para poder evaluar la señal detectada por el sensor ante nuevas alícuotas de proteína, la superficie del electrodo era lavada minuciosamente con agua tridestilada y secada a temperatura ambiente, según se describe en la metodología experimental. Vale la pena acotar que en principio se intentó efectuar el proceso de secado en la estufa; sin

embargo, esto trajo consigo una gran variabilidad de los resultados para réplicas efectuadas de una misma medición.

A continuación se reportan los resultados del estudio electroquímico para la posible detección de gliadina según el tipo de electrodo de trabajo utilizado:

3.6.2.1. Electrodo de grafito modificado GO/Fe.

En la figura siguiente se muestran los distintos voltamperogramas para un mismo electrodo de GO/Fe, en función de la cantidad de gliadina presente. En éstos se puede apreciar una disminución de la señal del pico de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ conforme aumenta la cantidad de gliadina depositada de manera ex situ en la superficie del electrodo de GO/Fe.

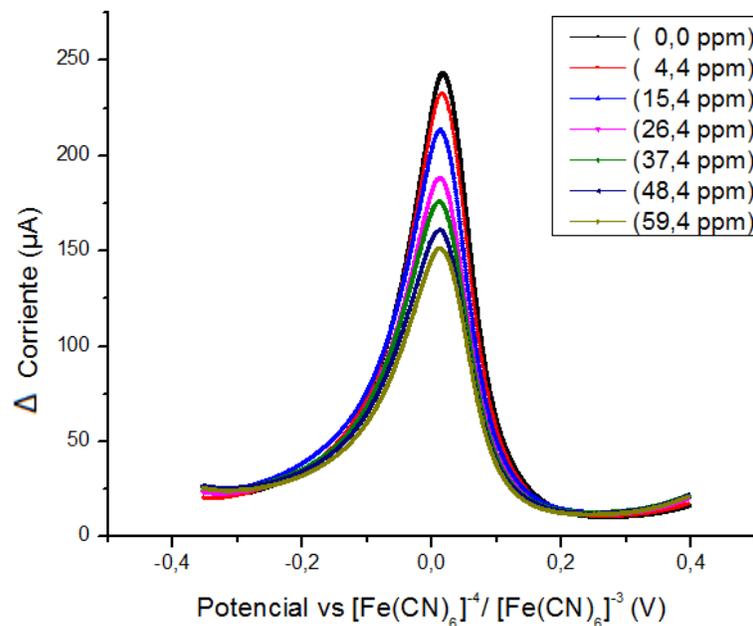


Figura 54. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Fe, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.

Luego, la representación gráfica de los valores de corriente de pico anódico (I_{pa}) en función de la concentración de proteína (ver *Figura 55*) muestra una relación de linealidad entre los datos, en el rango de concentración que abarca desde los 0 ppm hasta los 40 ppm. A partir de este punto, la curva cambia su comportamiento: se observa una ligera tendencia de los puntos graficados hacia un cierto valor límite de corriente.

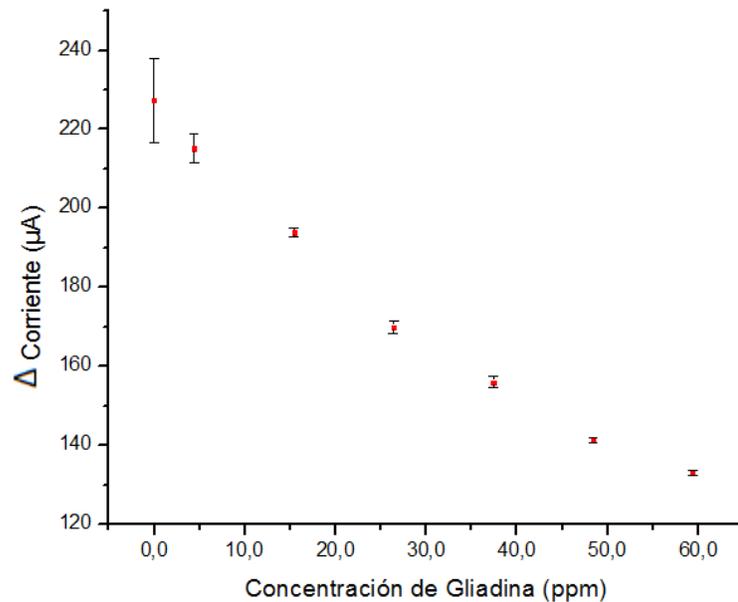


Figura 55. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) medida por un electrodo de GO/Fe, en función de la concentración de gliadina

En la *sección 3.7.*, se realiza un análisis más detallado acerca de la cuantificación y figuras de mérito asociados al método de análisis: elaboración de

curvas de calibrado; determinación del rango de linealidad, límite de detección, y otros parámetros asociados a la validación de los métodos analíticos.

3.6.2.2. Electrodo de grafito modificado GO/Cu

Se obtuvieron los voltamperogramas para distintas concentraciones de gliadina depositadas ex situ en la superficie de un electrodo de GO/Cu. Las curvas se muestran en la figura siguiente:

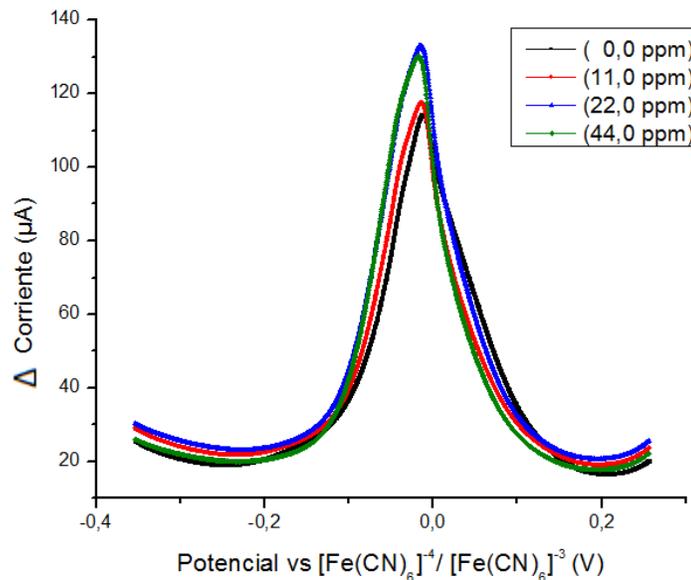


Figura 56. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Cu, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.

Cuando el sensor se construyó con el electrodo de GO/Cu, no fue posible la detección de gliadina, ya que las señales obtenidas no exhiben ninguna tendencia

conforme aumenta la concentración de proteína depositada en la superficie del electrodo. La curva de I_{pa} en función de la concentración de gliadina sólo constata el comportamiento, prácticamente constante, que se registró en la figura anterior. Además, cabe notar la alta incertidumbre asociada a las medidas, producto de una gran dispersión en los valores de I_{pa} obtenidos en las réplicas efectuadas para cada medición.

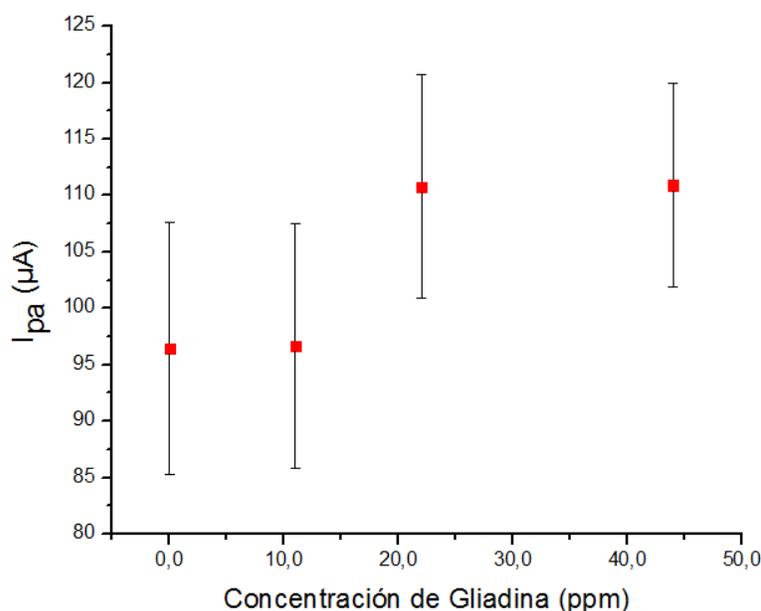


Figura 57. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) medida por un electrodo de GO/Cu, en función de la concentración de gliadina

Los resultados mostrados con la CuNps en las figuras anteriores, están asociados al estudio de la señal del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$; pero como no se obtuvo una buena respuesta por parte del electrodo, se procedió entonces a utilizar la

señal propia de las CuNps (Figura 58). De esta manera, se evaluó la respuesta del sensor por medio de una voltamperometría de onda cuadrada en la ventana de potencial que abarca desde los 0,196 V hasta los 0,746 V. La escogencia de este rango se realizó por los resultados obtenidos en la aplicación de la voltametría cíclica para los electrodos de GO/Cu (Figura 52); pues allí se detectó la onda de oxidación del conjunto $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}$. Las condiciones de pulso de potencial, frecuencia y amplitud se mantuvieron invariables.

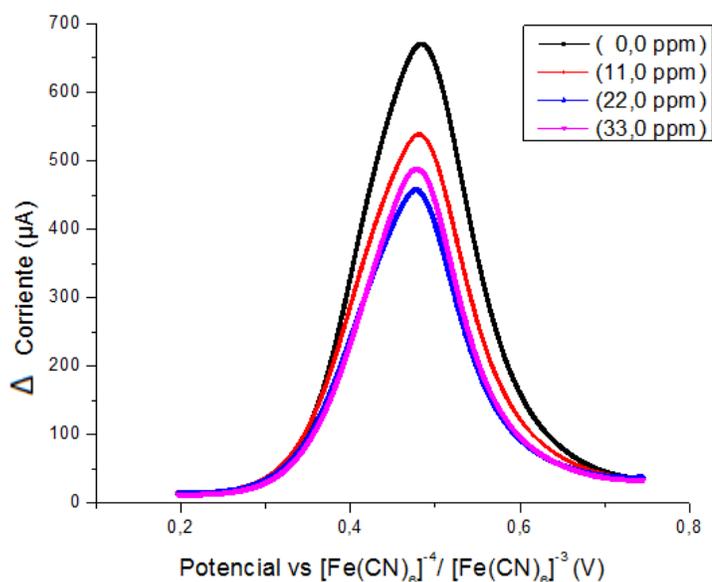


Figura 58. Voltamperogramas de onda cuadrada de la señal de oxidación del par $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}$, como respuesta de un electrodo de trabajo de GO/Cu, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.

La representación gráfica de la corriente de pico anódico en función de la concentración de gliadina reveló una disminución de la señal acorde con el incremento en la cantidad de proteína, en el rango de concentraciones entre 0 a 22 ppm. A partir de este punto, el sensor muestra desviaciones en su comportamiento original; esto puede

estar asociado a la saturación de sitios activos, pero consiste en un resultado esperanzador en el uso de electrodos de GO/Cu, pues con ellos se logra una detección directa de la gliadina, asociada a la oxidación de ésta catalizada con el Cu^{III} que se forma en la onda de 0,506 V (vs $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$), que está acorde a lo reportado en la bibliografía⁸¹⁻⁸³

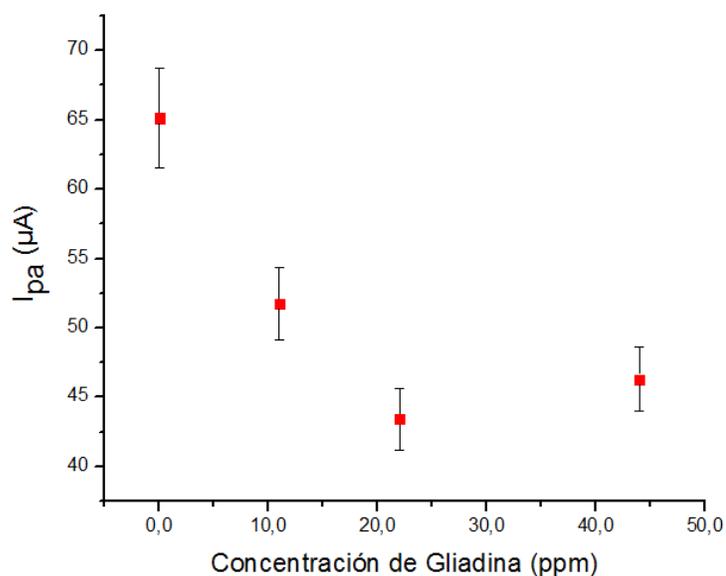


Figura 59. Corriente de pico anódico (de la señal de oxidación del par Cu/CuO) medida por un electrodo de GO/Cu, en función de la concentración de gliadina

Sin embargo, el rango lineal mostrado en la Figura 59, entre 11 a 22 ppm, resulta poco útil para un sensor por ser demasiado limitado. Se concluye entonces que, bajo estas condiciones de trabajo no es posible, la detección efectiva de gliadina mediante el uso de los electrodos de GO/Cu construidos según la metodología propuesta en este trabajo.

3.6.2.3. Electrodo de grafito modificado GO

El uso de electrodos sin partículas metálicas, esto es, electrodos modificados solamente con GO, al igual que en el caso de los electrodos GO/Cu no generó ningún patrón de comportamiento en las medidas de la señal del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Observe el conjunto de voltamperogramas de onda cuadrada (*Figura 60*) que recogen la información del comportamiento electroquímico de este electrodo de trabajo ante la presencia de gliadina.

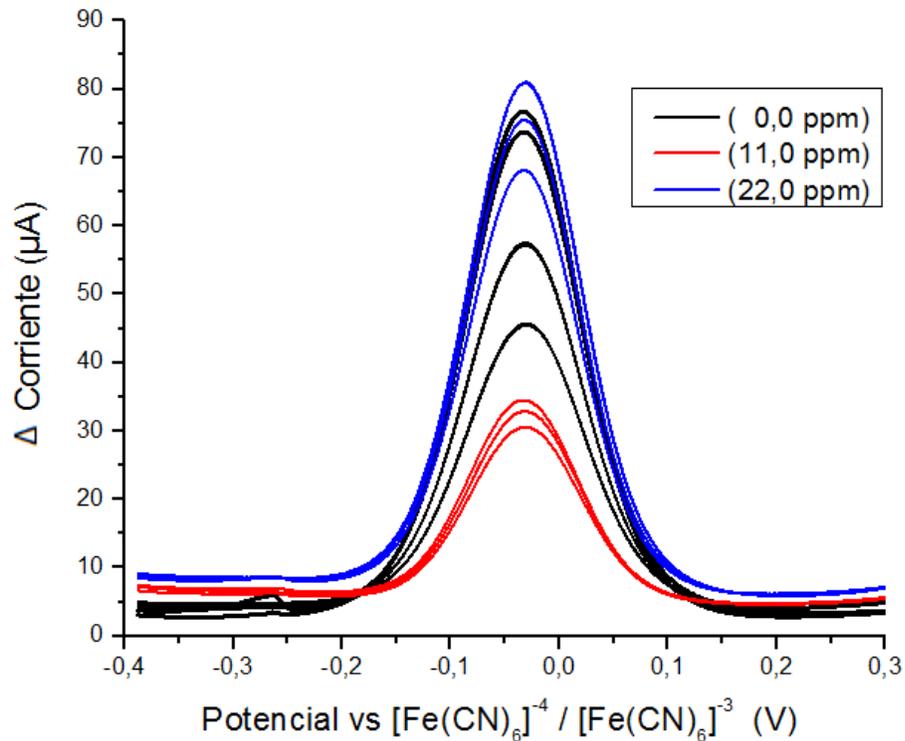


Figura 60. Voltamperogramas de onda cuadrada como respuesta de un electrodo de trabajo de GO, de acuerdo a la concentración de gliadina depositada en su superficie.

3.6.2.4. Análisis de la detección de gliadina

Por todos los argumentos expuestos a lo largo de esta sección de análisis, se infiere que para la funcionalidad del sensor de gliadina es imprescindible la presencia de las Nps de Fe_xO_y . Ahora bien, la inhibición de la señal del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, se pudiera explicar mediante una disminución en la cantidad de sitios activos en la superficie del electrodo (ver *Figura 61*), lugar donde ocurre el proceso de oxidación descrito por la ecuación [10]. Cuando la gliadina es adsorbida (preferencialmente sobre las Nps de óxido de hierro), se envenena parcialmente el electrodo y se inhibe la oxidación del $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ que ocurre sobre las FeNps, e incluso, sobre el grafeno/grafito. Es posible que el tamaño nanométrico de las partículas de Fe_xO_y y la naturaleza de las mismas, influyera en la funcionalidad del sensor, al aportar una mayor superficie específica susceptible a la presencia de la proteína. De hecho, está documentada la capacidad de una diversidad de Nps en la adsorción de biomoléculas; jugando un papel importante en la inmovilización de éstas para el desarrollo de sensores.⁸³

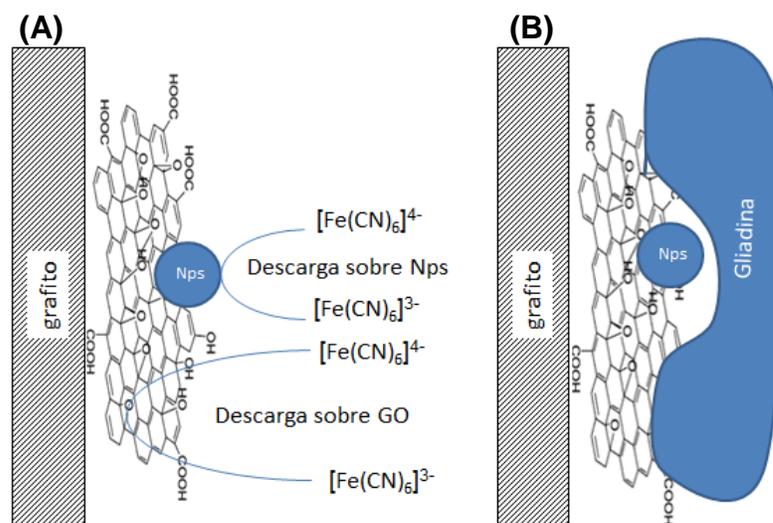


Figura 61. Propuesta de Mecanismo de acción del sensor. **(A)** La oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ocurre sobre las Nps y, aunque en menor grado, sobre el GO. **(B)** La adsorción de la gliadina sobre la superficie, bloquea sitios activos e impide la oxidación del par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

3.7. Cuantificación de gliadina a través de voltamperometría de onda cuadrada. Determinación de las figuras de mérito estadístico.

3.7.1. Análisis de la precisión.

En la *sección 3.6.* quedó demostrada la capacidad del sensor (de GO/Fe) para detectar a la gliadina; sin embargo, es necesario evaluar otros parámetros intrínsecos al método utilizado. Uno de ellos lo constituye la precisión asociada a diferentes réplicas del mismo experimento bajo condiciones que se mantienen constantes a lo largo de todo el proceso de medición, es decir la replicabilidad del método. Para evaluar este aspecto, se midió numerosas veces la señal de I_{pa} generada por una misma solución de gliadina (de concentración igual a 11,0 ppm), usando un mismo electrodo de GO/Fe. Además, todas las mediciones se realizaron el mismo día, en intervalos cortos de tiempo y de manera consecutiva.

En el gráfico de barras siguiente, se representan los valores producto de este experimento; obteniéndose que la dispersión de los resultados, representada por la desviación estándar relativa, es sólo de un 1,97%

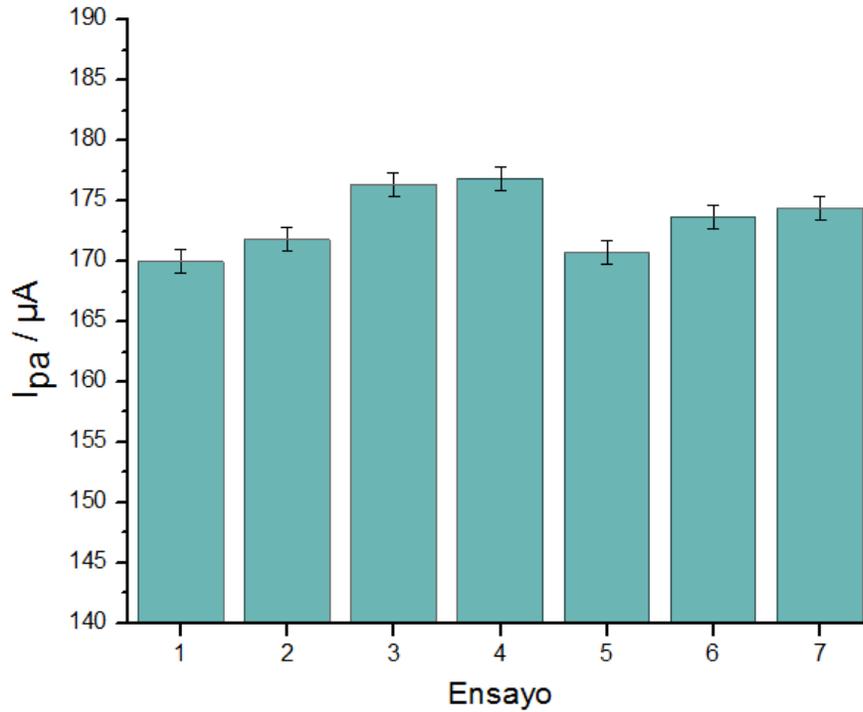


Figura 62. Gráfico de los valores de la corriente de pico anódico de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, para distintas réplicas de una solución de gliadina al 11,0 ppm; usando un electrodo de grafito modificado GO/Fe.

También es necesario plantear el estudio de la reproducibilidad del método, es decir, evaluar la dispersión de los resultados originados por la aplicación del mismo método a alícuotas del mismo analito, pero usando diferentes electrodos de trabajo GO/Fe en períodos de tiempo distintos. En este sentido, los resultados de la evaluación de la señal de una cantidad predeterminada de gliadina (22,0 ppm), para tres electrodos distintos, usados en días diferentes, se indican en el siguiente gráfico de barras:

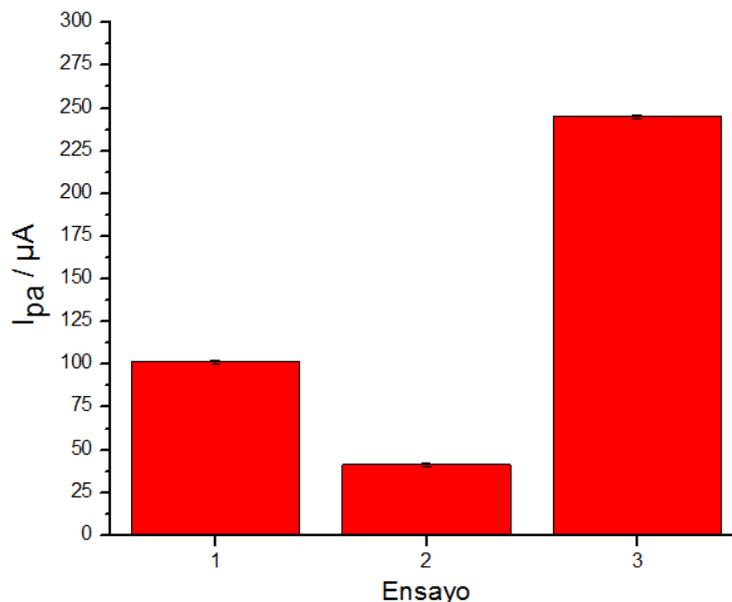


Figura 63. Gráfico de los valores de la corriente de pico anódico de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, como respuesta de tres electrodos distintos de GO/Fe al medir la respuesta de una solución de Gliadina al 22,0 ppm.

Observe que existe una gran variabilidad entre los valores experimentales; con una alta dispersión del 80,90% (DER). Las causas de esta disparidad probablemente sean inherentes a cada electrodo y asociadas a su *proceso de preparación*: Si bien las cantidades de los agentes modificantes fueron meticulosamente medidas y depositadas en la superficie de cada electrodo, puede aseverarse, con base en las imágenes obtenidas mediante MEB, que la distribución de las partículas adsorbidas en la superficie del electrodo, ocurre de manera no homogénea; por ende, debe esperarse un notorio efecto negativo sobre en la reproducibilidad del método. Por este motivo, para hacer posible la detección de la proteína y así, eliminar (o al menos minimizar) la influencia que acarrea “la preparación del electrodo” en las mediciones, se procedió a sustraer la señal del blanco (I_b) a cada medida de corriente de pico (I_{pa}) obtenida. Luego, el valor absoluto de esta diferencia fue normalizada respecto a la señal de dicho blanco; es decir, se aplicó la siguiente ecuación:

$$I_{rpa} = \frac{|I_{pa} - I_b|}{I_b} \quad [11]$$

A los valores de corriente de pico corregidos se les designó con el nombre de “*corriente relativa de pico anódico*” (I_{rpa}), y representan la corriente de pico de la señal medida por el electrodo, que resulta independiente de la cantidad efectiva de nanopartículas y óxido de grafeno depositados, forma de la superficie, distribución de las capas de los modificante en el electrodo, concentración de la solución **A** y otros factores que pueden variar entre electrodos distintos, debido a la preparación de éstos.

Los resultados de la corrección de la señal I_{pa} correspondiente a los 3 electrodos de la *Figura 64*, se reportan a continuación, y se comparan con los valores originales:

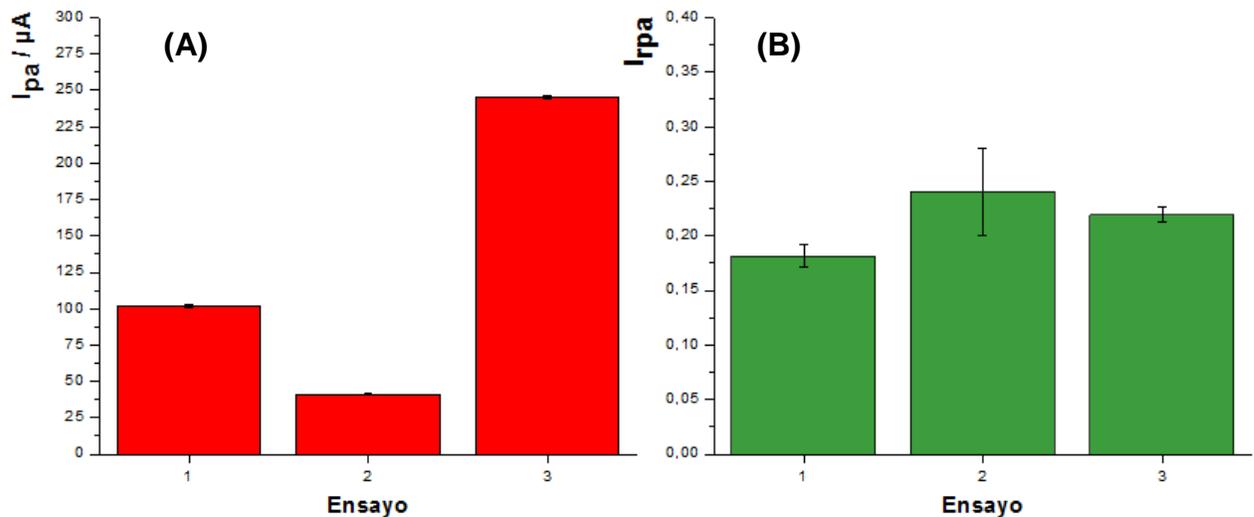


Figura 64. Gráfico de los valores de (A) I_{pa} y (B) I_{rpa} , de la señal de oxidación, obtenida mediante VOC, como respuesta de tres electrodos distintos de GO/Fe al medir la respuesta de una solución de gliadina al 22,0 ppm.

La dispersión calculada para los resultados “corregidos” viene representada por una desviación estándar relativa de 13,92%. A pesar de que esta cifra es aún bastante alta (por ser mayor al 5%), representa una gran mejora con respecto al valor de DER obtenido anteriormente.

Obviamente, es necesario utilizar algún otro método para conseguir de manera más efectiva la deposición de los agentes modificantes en la superficie de los electrodos, y con ello, minimizar el efecto sobre las medidas que acarrea la preparación de éstos.

3.7.2. Curvas de calibración para las mediciones que implicaban el uso de electrodos de GO/Fe.

Para conocer la respuesta de la *señal corregida* del sensor a diferentes concentraciones de gliadina, se realizó un calibrado con concentraciones de proteína comprendidas entre 0 ppm y 60 ppm, usando un electrodo de GO/Fe.

A continuación se muestra la curva de calibración producto de la representación gráfica de los datos de corriente I_{rpa} en función de la concentración de gliadina depositada ex situ en la superficie:

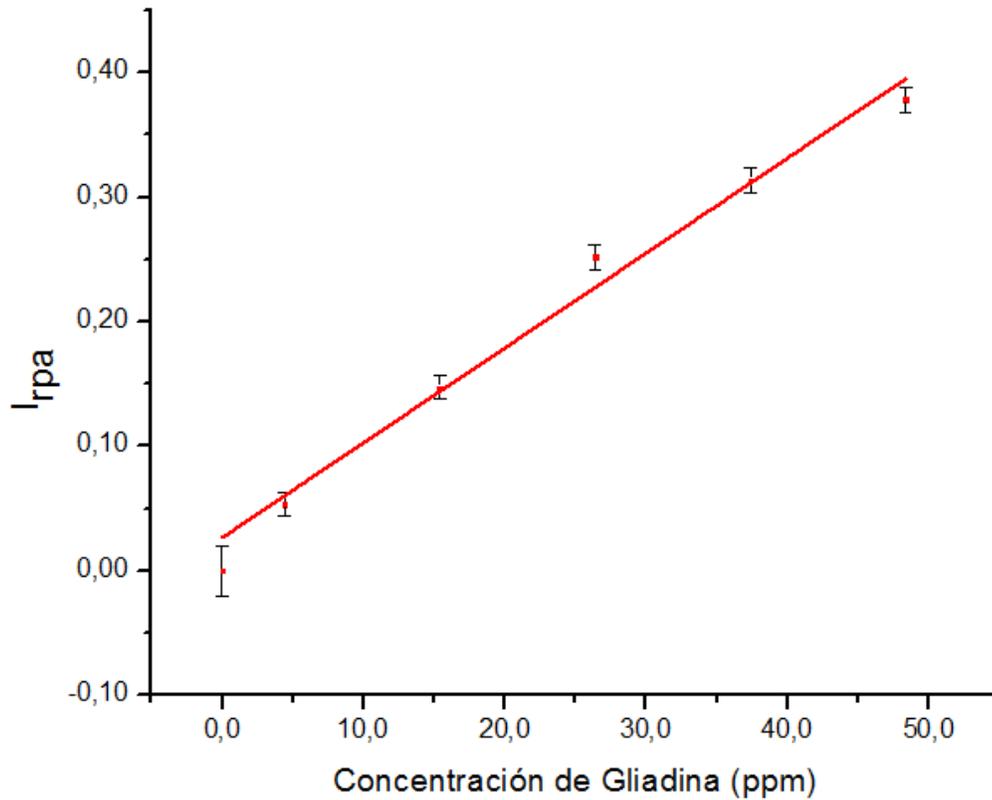


Figura 65. Curva de Calibración de la corriente I_{rpa} en función de la concentración de gliadina depositada sobre un electrodo de GO/Fe

La regresión lineal se obtuvo mediante el método de mínimos cuadrados, a través del programa OriginPro 8.5. Entonces, la ecuación de la recta de calibración viene dada por:

$$I_{rpa} = (8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}) \cdot C_{Gliá} + 13,36 \times 10^{-3} \quad [12]$$

Donde, $C_{Gliá}$ representa la concentración de gliadina. Por otra parte, el error de la calibración (denotado por el estadístico $S_{y/x}$), así como otros parámetros asociados a la curva de calibrado, han sido reportados en el siguiente cuadro:

Tabla 8. Parámetros asociados a la curva de calibración de la Figura 46.

Error de Calibrado ($S_{y/x}$)	$19,36 \times 10^{-3}$
Coeficiente de Correlación (R^2)	0,9829
Pendiente	$8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Desviación Estándar de la Pendiente	$0,47 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Punto de Intercepto	$13,36 \times 10^{-3}$
Desviación Estándar del Intercepto	$8,11 \times 10^{-3}$
Rango Lineal	0,0 – 48,4 ppm

En lo que respecta a las figuras de méritos que derivan del análisis estadístico de los datos de la *Tabla 8*, se puede establecer lo siguiente:

Linealidad: Para la curva de calibración se reporta un índice de correlación (R^2) de 0,9829; y como consecuencia, se puede afirmar que los datos poseen un buen comportamiento lineal. Para este caso, el rango de linealidad del sensor abarca desde los 0,0 ppm hasta los 48,4 ppm.

Sensibilidad (S): Se refiere a la capacidad por parte del sensor para la distinción entre concentraciones muy cercanas. Analíticamente, puede utilizarse la pendiente como medida de la sensibilidad.⁸⁴ De esta forma, a partir de la información suministrada en la *Tabla 8*, se reporta un valor de $8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$.

Límite de Detección (LOD): Determina la mínima cantidad de analito en la muestra que puede ser detectada; y cuya señal es analíticamente distinta a la que genera el blanco. Puede ser definido como la concentración de analito (gliadina) cuya señal es la del blanco más tres veces la desviación estándar de la curva de calibrado⁸⁴, es decir:

$$S_{\text{LOD}} = S_{\text{blanco}} + 3 \cdot S_{y/x} \quad [13]$$

Donde S_{LOD} es la señal de corriente I_{rpa} de la concentración de analito que representa al LOD; S_{blanco} es la señal del blanco; y $S_{y/x}$ es la desviación estándar típica de la regresión lineal. Para este electrodo, debido a la aplicación de la ecuación de normalización, la señal del blanco es de 0,00. Luego, la aplicación de la *ecuación [11]* y la evaluación del valor resultante en la *recta de calibrado [12]*, permite obtener un LOD de 5,5 ppm.

Este resultado resulta prometedor en cuanto al futuro desarrollo de sensores con aplicabilidad en la detección de bajas concentraciones de la proteína a nivel industrial; pues según la región geográfica, se han definido límites que representan la cantidad mínima de gluten que deben contener los alimentos, para que éstos sean catalogados como “exentos” de la proteína. En Europa, el Codex Alimentarius establece que alimentos dentro de esta categoría deben poseer concentraciones de gluten menores a los 20 mg por Kg del alimento, es decir, de 20 ppm. En Japón, el límite lo constituye 10 ppm; en tanto que, en Australia es de 3 ppm.¹⁴ En Latinoamérica, muchos países no

han definido un reglamento en lo concerniente a la cantidad de gluten máxima que deben contener los denominados alimentos “libres de gluten”; otros por su parte, se guían por el Codex Alimentarius de Europa.

Límite de Cuantificación (LOC): Determina la mínima cantidad de analito en la muestra que puede ser detectada con precisión y exactitud. Está definido como la concentración de analito (gliadina) cuya señal es la del blanco más diez veces la desviación estándar de la curva de calibrado⁸⁴, es decir:

$$S_{\text{LOC}} = S_{\text{blanco}} + 10 \cdot S_{y/x} \quad [14]$$

Donde S_{LOD} es la señal de corriente I_{rpa} de la concentración de analito que representa al LOD; S_{blanco} es la señal del blanco; y $S_{y/x}$ es la desviación estándar típica de la regresión lineal. El cálculo resultante indica que el LOC es de 22,2 ppm

En la literatura, los parámetros de mayor relevancia para establecer comparación entre distintos métodos son el LOD y el rango lineal. A continuación se reporta una tabla informativa que recoge los valores de estas cifras de mérito para distintos ensayos y sensores de gliadina, desarrollados mediante diversas técnicas. La Tabla fue extraída del trabajo de Chekin (2016).³⁷

Tabla 9. Cifras de méritos de varios ensayos y sensores de Gliadina

Método	Tipo de Ensayo	Rango Lineal	LOD	Ref
Colorimetría	Elisa tipo Sandwich, uso del anticuerpo R5	-	0,5 ppm	(A)
EIS	Detección Directa con los fragmentos Fab de antigliadina	1-20 ppm	0,420 ppm	Nassef, H.M. (2009). ⁸⁵
VPD	Detección directa	-	7,11 ppm	Nassef, H.M. (2008) ²³
CA	Ensayo competitivo con uso de Aptámeros	-	4,9 ppb (Gli 1) 0,5 ppb (Gli 4)	González, S. (2015) ²⁶
CA	Detección Directa, uso de fragmentos Fab de antigliadina	5-30 ppb	3,29 ppb	Nassef, H.M. (2009). ⁸⁵
Potenciometría	E-tongue (con un conjunto de 36 membranas poliméricas)	-	1-2 ppm	Meirinho, S. (2011) ¹⁴
Fluorescencia	Magnetic beads, anticuerpos	10-500 ppm	0,6 ppm	Chu, P. (2013) ⁸⁶
QCM	Uso de anticuerpos	10-20 ppb	8 ppb	Chu, P. (2012) ⁸⁷
PCR Cuantitativo	Ensayo competitivo con uso de Aptámeros	-	0,1 ppm	Pinto, A. (2014) ⁸⁸
VPD	Uso de anticuerpos	1,2-34 ppb	12 ppb	Chekin, F. (2016) ³⁷
VOC	Este proyecto	0 – 44,4 ppm	5,5 ppm	--

EIS= Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (por sus siglas en inglés). CA= Cronoamperometría. QCM= Microbalanza de Quartz (por sus siglas en inglés).

(A) Especificaciones del producto en: [//www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/gliadingleuten/item/ridascreen-gliadin](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/gliadingleuten/item/ridascreen-gliadin)

Todas estas técnicas utilizan anticuerpos para garantizar la detección del analito, a excepción de González S.²⁶, que se vale del uso de aptámeros, que no son más moléculas biológicas, sintetizadas en un medio que contiene al analito, lo que permite que su estructura tridimensional adopte una configuración espacial adaptable a la forma de dicho analito. Entonces, debido a las reacciones específicas entre la gliadina y el anticuerpo/áptamero, se justifica que muchas de estas metodologías^{26,37,85,86,88} presenten LOD menores al nuestro.

Sin embargo, en la Tabla anterior no dejan de existir casos en los que el LOD de nuestro método tiene una magnitud comparable al reportado por otros proyectos. Destaca el caso de Nassef, H.M.²³ que reporta un LOD de 7,11 ppm; y el de Meirinho, S.¹⁴, que obtuvo 1-2 ppm.

3.7.3. Reproducibilidad en las curvas de calibración.

En la *sección 3.6.1*.ya se estudió la precisión en las respuestas del método para una concentración fija de gliadina usando electrodos distintos de GO/Fe; sin embargo, se desea proseguir con el estudio de reproducibilidad mediante la comparación de tres curvas de calibrados obtenidas para 3 electrodos distintos, evaluados en días diferentes. En particular, la pendiente de la curva de calibración, así como el punto de intercepto con el eje de las ordenadas, pueden ser usadas como índice para evaluar la reproducibilidad. A continuación, se anexa la representación gráfica de las tres curvas de calibrado:

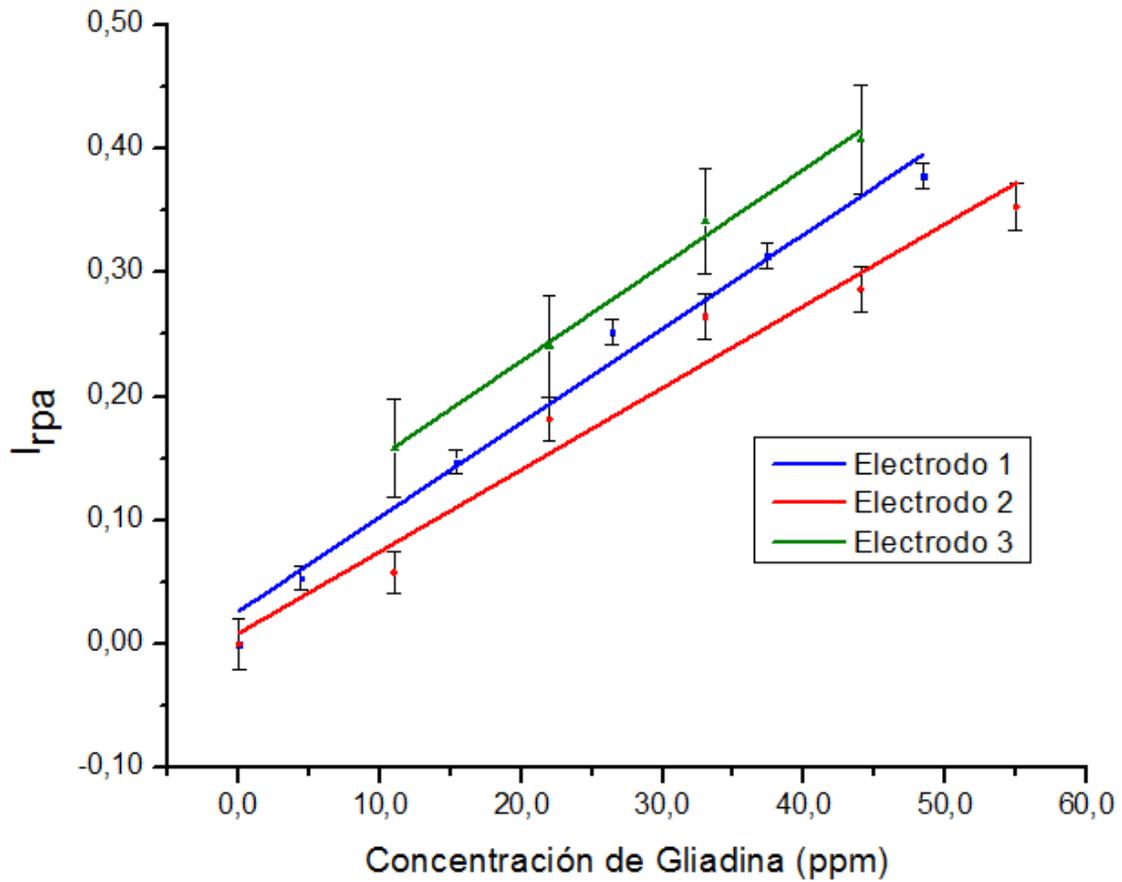


Figura 66. Curvas de Calibración de la corriente I_{rpa} en función de la concentración de gliadina depositada sobre electrodos distintos de GO/Fe.

Por su parte, en la *Tabla 10*, se reportan los parámetros de interés asociados a las curvas de calibración mostradas en la *Figura 66*.

Tabla 10. Parámetros asociados a las curvas de calibración de la *Figura 47*

	Electrodo 1	Electrodo 2	Electrodo 3
Error de Calibrado ($S_{y/x}$)	$19,36 \times 10^{-3}$	$28,96 \times 10^{-3}$	$10,33 \times 10^{-3}$
Coefficiente de Correlación (R^2)	0,9829	0,9553	0,9967
Pendiente	$8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$7,22 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$7,67 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Desviación Estándar de la Pendiente	$0,47 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$0,70 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$0,23 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Punto de Intercepto	$13,36 \times 10^{-3}$	$-3,98 \times 10^{-3}$	$73,62 \times 10^{-3}$
Desviación Estándar del Intercepto	$8,11 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-3}$	$6,33 \times 10^{-3}$
Rango Lineal	0,0 – 48,4 ppm	0 – 55,0 ppm	11,0 – 44,0 ppm

De esta manera, según la *Tabla 10*, la comparación entre los valores de las tres pendientes genera una DER de tan sólo 5,80%, lo cual representa un resultado adecuado no sólo para la *reproducibilidad* sino para la *sensibilidad* del sensor, la cual se preserva independientemente del electrodo utilizado. Sin embargo, la DER asociada al valor del intercepto con el eje de las ordenadas, es notablemente muy alta: 147,22%. Puesto que el intercepto está asociado a la respuesta del sensor ante la ausencia del analito; este hecho sugiere que, a pesar de la mejora en los resultados por la aplicación de la *ecuación [11]*, todavía persisten los efectos asociados a la *preparación del electrodo*.

Por otra parte, en los tres calibrados se obtuvo un valor del índice de correlación (R^2) por encima de 0,9000; lo que implica, que los datos graficados pueden ser modelados adecuadamente a través de una regresión lineal. Sin embargo, es evidente una variación en el rango de linealidad del sensor en función del electrodo utilizado.

Durante el desarrollo experimental, las mediciones culminaban en el momento en que la señal de corriente se mantenía invariante a pesar de la continua adición de gliadina. Por ende, para el *electrodo 1*, el punto de saturación de gliadina fue alcanzado a los 48,4 ppm; y para los *electrodos 2 y 3*, la saturación ocurrió a los 55,0 ppm y 44,0 ppm, respectivamente. Podría suponerse que el punto de saturación esté probablemente relacionado con el paso que implica la *preparación del electrodo*, más específicamente, con la cantidad de GO y de nanopartículas de Fe_xO_y que logran depositarse efectivamente en la superficie del grafito, es decir, el número de nanopartículas estaría directamente relacionado con la cantidad máxima de gliadina que puede adsorberse en la superficie y, por ende, define el límite máximo que puede ser detectado.

3.8. Pruebas de Reutilización del Electrodo GO/Fe

Para evaluar la posibilidad de reutilizar los electrodos de GO/GO, se aplicaron dos metodologías para el lavado de la superficie:

3.8.1. Análisis del Método 1.

En esta sección, para el lavado de la superficie del electrodo 3 (mostrado en la *Figura 66*), se usó de etanol (60 %v/v), en la cual, dicho electrodo se mantuvo

sumergido durante 48 h. Con este paso se esperaba disolver la gliadina adsorbida en la superficie.

Posteriormente, cuando se evaluó su capacidad de respuesta para la adición de nuevas concentraciones de gliadina, los resultados obtenidos resultaron deficientes: Primero, la señales de corriente I_{pa} no mostraron una tendencia definida conforme aumenta la cantidad de gliadina depositada en el electrodo (ver *Figura 67*). Segundo, existe una gran diferencia de las respuestas cuando se comparan con los valores originales que fueron medidos por el mismo sensor (ver *Figura 69*). En este sentido, las diferencias porcentuales son de 388%, 25% y 70% al medir concentraciones de gliadina iguales a 11,0 ppm, 22,0 ppm y 33,0 ppm, respectivamente.

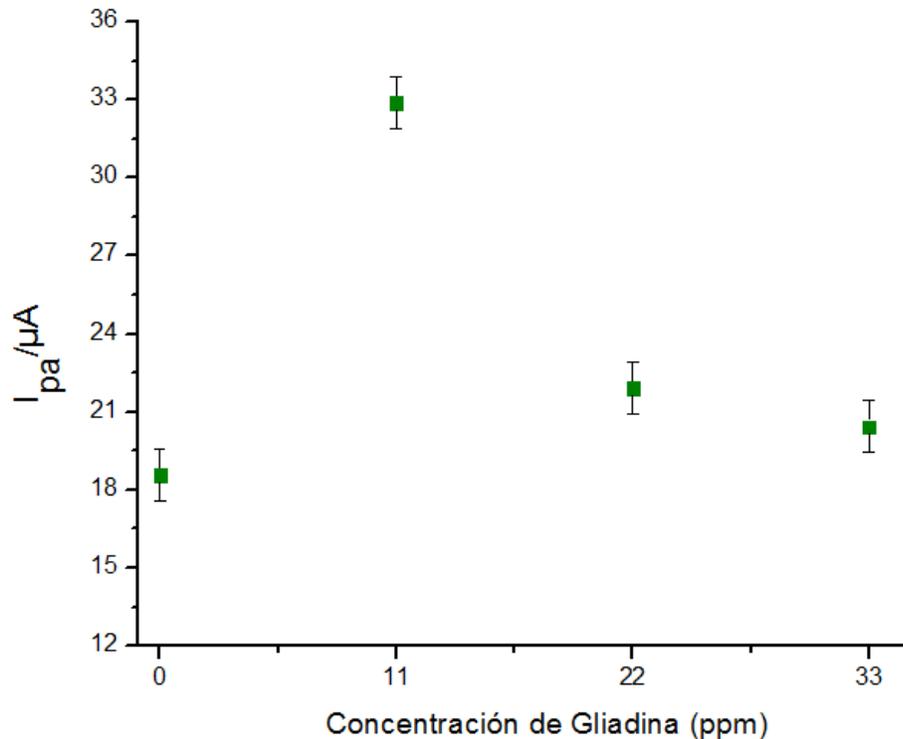


Figura 67. Señales de Corriente I_{pa} obtenidas por el sensor reutilizado al medir distintas concentraciones de gliadina.

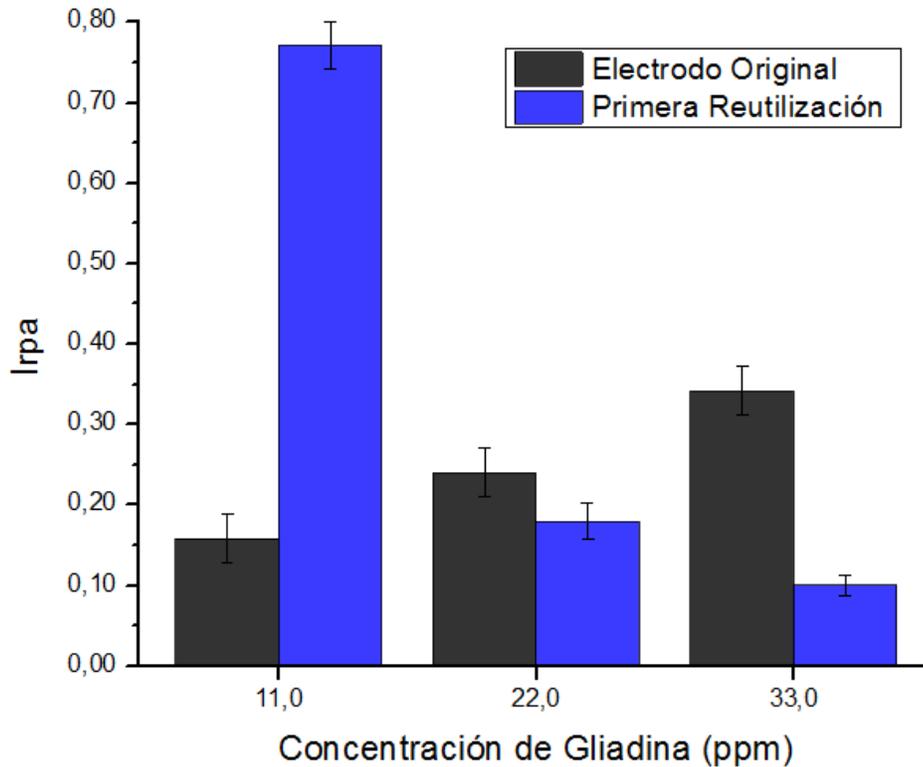


Figura 68. Comparación de las repuesta de I_{rpa} entre el sensor Original y el Sensor Reutilizado.

3.8.2. Análisis del Método 2.

En este apartado, se propuso un primer lavado con una solución de HCl a pH 6 durante pocos minutos, seguido de un lavado con etanol (60 %v/v) por 48 horas. El ácido cumple con la función de desnaturalizar a la proteína, para facilitar su desprendimiento de la superficie del electrodo con la posterior ayuda dell etanol al 60%. Además, la insolubilidad del GO y de las nanopartículas de Fe_xO_y en un medio ligeramente ácido, fue lo que permitió el uso del solvente, sin el riesgo de modificar la superficie del electrodo de GO/Fe.

Ahora bien, la nueva curva de calibración obtenida a partir del electrodo reutilizado se ha representado en la siguiente Figura. También se ha incorporado la curva de calibrado original.

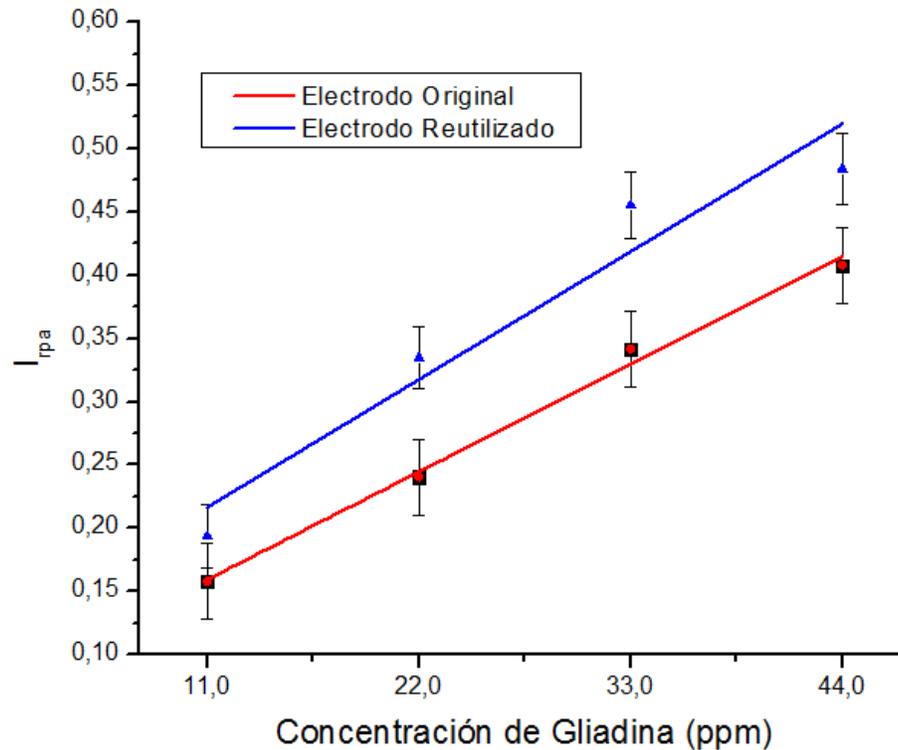


Figura 69. Curvas de Calibrado de Calibrado del Electrodo de GO/Fe antes y después de su Reutilización, tas aplicar el método 2.

En la *Tabla 11* se comparan las distintas características de ambas curvas de calibrado. Observe que la sensibilidad (representada por la pendiente de la ecuación de la recta) se mantuvo alrededor de su valor original, siendo la diferencia solamente de un 16,51%. Como desventaja se presentó una disminución en la linealidad de la curva, lo

cual queda en evidencia, por el deficiente valor que presentó el índice de correlación ($R^2 = 0,90576$). Además, el valor del intercepto, difiere en 36%; sin embargo, esto sólo sugiere la existencia de diferencias en la superficie del electrodo, probablemente a raíz del propio método de lavado.

Por supuesto, estos resultados implican un avance notable, si se compara con aquellos obtenidos para la aplicación del primer método de lavado.

Tabla 11. Parámetros asociados a las curvas de calibración de la *Figura 69*

	Electrodo Original	Electrodo Reutilizado
Coeficiente de Correlación (R^2)	0,9967	0,90576
Pendiente	$7,67 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$9,19 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Desviación Estándar de la Pendiente	$0,23 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$	$0,92 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$
Punto de Intercepto	$73,62 \times 10^{-3}$	$115,32 \times 10^{-3}$
Desviación Estándar del Intercepto	$6,33 \times 10^{-3}$	$10,5 \times 10^{-3}$

3.9. Pruebas de Selectividad.

Se decidió evaluar la capacidad del almidón y la glucosa como interferentes en la detección de gliadina. El primero, por ser un componente de la harina de trigo, que generalmente se encuentra en un 60-70%.⁸⁹ El segundo, por ser un ingrediente común para endulzar productos comerciales: galletas, pasteles, etc. A continuación se reportan los resultados obtenidos:

Tabla 12. Resultados de las Pruebas de Interferencias usando como electrodo de trabajo al GO/Fe.

Prueba 1		Prueba 2		Prueba 3	
Condiciones	$I_{pra}/10^2$	Condiciones	$I_{pra}/10^2$	Condiciones	$I_{pra}/10^2$
Gliadina (11,0 ppm)	7,34	Gliadina (11,0 ppm)	7,34	Gliadina (11,0 ppm)	12,43
Gliadina (11,0 pm) Almidón (11,0 ppm)	7,87	Gliadina (11,0 pm) Almidón (22,0 ppm)	10,39	Gliadina (11,0 pm) Glucosa (11,0 ppm)	20,75
Diferencia Porcentual (%)	7,22	Diferencia Porcentual (%)	41,55	Diferencia Porcentual (%)	66,93

Esta prueba busca evaluar si el método analítico en desarrollo entrega una señal medible correspondiente sólo a la presencia del analito de la muestra sin interferencia de impurezas. Como puede apreciarse, el almidón no es un interferente importante a concentraciones iguales con respecto a la gliadina (Prueba 1); pues la respuesta sólo difiere en 7,22%; sin embargo, cuando su concentración se duplica, produce una alta desviación en la respuesta del sensor, del orden de los 41,55% (Prueba 2). Por su parte, la glucosa afectó a la medida en un 66,93%.

Sin embargo, para el análisis de muestras reales (ver la *sección 3.10*) se propuso aplicar un pretratamiento que consiste en someter a la muestra a la extracción de la gliadina a partir de una solución etanólica al 60% v/v. En dicha solución el almidón es insoluble y la glucosa solo se solubiliza en una muy pequeña parte; por ende, existe poca probabilidad de que ambos interfieran en las mediciones.

3.10. Análisis de la Muestra Real

Se debe evaluar la aplicabilidad del sensor a una muestra real, en este caso, harina de trigo comercial (**Marca Robin Hood**); para lo cual, una porción de 24,72 mg de la muestra fue sometida a un pretratamiento que buscaba la extracción de la gliadina de la harina, usando 20 mL de etanol al 60 %v/v. El sobrenadante de esta mezcla fue separado por centrifugación y reservado para la prueba correspondiente.

Sin embargo, antes de medir la respuesta del sensor, es prioritario conocer de antemano el valor arrojado por el blanco para el electrodo de GO/Fe destinado a ser usado en este experimento. Esto por la simple razón que se mencionó en la *sección 3.6.1*: la medida de la señal estaba fuertemente influenciada por la manera en que se llevó a cabo la *preparación del electrodo*

Este valor fue evaluado en las tres curvas de calibrado de la *Figura 66*. Luego, a partir de la ecuación de cada una, aplicando las cuentas necesarias se determinó la concentración de gliadina en la muestra problema. Los resultados se reportan en la Tabla siguiente:

Tabla 13. Determinación de gliadina en la muestra de Harina de Trigo Marca Robin Hood, usando un electrodo de GO/Fe.

Señal Blanco	Señal de la Muestra	Señal Corregida	Gliadina en la muestra
115 μ A	95 μ A	0,17	(2,3\pm0,1)%

Ante la imposibilidad de aplicar un método alternativo para medir el contenido de gliadina en el alimento y establecer una comparación con nuestro resultado; entonces con base en la bibliografía, se ha estimado el rango de la proteína contenida en los alimentos:

Dupont et. al.⁶⁴ reporta un contenido relativo al 4,8% de gliadinas. Por su parte, Eckert et. al.⁶⁵ establece un rango entre 4,90% a 7,51%. Meirinho¹⁴ mide la concentración de gluten por Kg de alimento para dos marcas de harina de trigo distintas: En la primera obtiene un 11297 mg/Kg (1,13%); y en la segunda, 10562 mg/Kg (1,05%). En los tres métodos la cuantificación se realizó mediante técnicas de HPLC.

Por lo tanto, la concentración de gliadina determinada (ver *Tabla 13*), está acorde con los valores reportados en la bibliografía.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

La extracción de gliadina a partir de la harina de trigo se realizó de manera exitosa con un rendimiento de 38%, a través de la aplicación del método propuesto por Eckert. La caracterización por electroforesis PAGE-SDS confirmó la presencia de gliadinas, y poco grado de contaminación.

El óxido de grafeno se obtuvo por la exfoliación de barras de grafito, inducida por electrólisis. La caracterización por DRX reveló que el GO sintetizado estaba compuesto por cristales de 134, 34 y 11 capas de grafeno. Por su parte, mediante espectroscopía UV-visible fue posible detectar la banda de absorción ($\lambda=265$ nm) característica del GO.

La síntesis química de Nps Fe_xO_y resultó en la obtención de nanopartículas esférica que fueron caracterizadas mediante MEB, DLS y espectroscopía UV-visible. En las dos primeras técnicas se obtuvo tamaños de partículas de 78 nm y 15 nm, respectivamente; por su parte, en el análisis por espectroscopía UV-visible fue posible detectar el PSR ($\lambda=362$ nm) característico de las Nps de óxido de hierro.

Bajo las condiciones de síntesis aplicadas, no fue posible la obtención de las Nps de Cu, pues la caracterización por MEB y DLS confirmó que el tamaño de las partículas se encontraba en el orden de las micras.

Se logró la detección de gliadina con dos de los electrodos desarrollados en este trabajo (GO/Fe y GO/Cu), sin necesidad del uso de los anticuerpos de la gliadina. Sin embargo, sólo el primero resultó funcional para efectuar un análisis cuantitativo.

El electrodo GO/Cu logra medir la respuesta de la gliadina de manera directa sobre la inhibición de las señales propias de electrodo, en un rango de concentraciones (11,0-22,0 ppm).

Se determinaron las principales cifras de mérito para el método basado en el uso de electrodos de GO/Fe: (a) un rango dinámico lineal comprendido en 0,0ppm-44,8 ppm; (b) límite de detección de 5,5 ppm; (c) límite de cuantificación de 22,2 ppm y (d) sensibilidad de $8,11 \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$.

La reproducibilidad de las medidas depende en gran medida de la preparación de electrodo.

Para una muestra de harina de trigo y usando el electrodo de GO/Fe, se determinó que la cantidad de gliadina que compone a la harina es de $(2,3 \pm 0,1)\%$.

4.2. Recomendaciones.

Optimizar cada uno de los parámetros del método, con especial enfoque en lo que concierne a la preparación de los electrodos modificados, es decir, metodologías para la incorporación del agente modificante.

Enfocar el estudio hacia el desarrollo de mejores condiciones que permitan la utilización de los electrodos de GO/Cu como sensores; pues resultan prometedores debido a su capacidad de detectar directamente a la gliadina a través de la inhibición de la misma señal redox de las partículas de cobre.

Poner a prueba la exactitud del sensor en el estudio de una muestra real, comparando la respuesta con algún método o ensayo que permita la detección confiable de gliadina. Si bien en este proyecto no se pudo realizar por limitaciones financieras.

Como la reacción del sistema Ferro - Ferri es de esfera externa (depende del sustrato utilizado), se propone normalizar las voltametrías de onda cuadrada por la carga cuando el electrodo es saturado de solución de ferrocianuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. Liu, Y., Han, Y., Chen, R., Zhang, H., Liu, L., Liang, F. "In situ Immobilization of Copper Nanoparticles on Polydopamine Coated Graphene Oxide for H₂O₂ Determination". PLoS One. 2016; 11(7).
 2. Yao, Y., Liua, Y., Yang, Z., "A novel electrochemical sensor based on a glassy carbon electrode modified with Cu-MWCNT nanocomposites for determination of hydroquinone". Anal. Methods. 2016; 8: 2568-2575
 3. Cui, H., Yang, W., Li, X., Zhaoa, H., Yuana, Z. "An electrochemical sensor based on a magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and gold nanoparticles modified electrode for sensitive determination of trace amounts of arsenic(III)" Anal. Methods. 2012; 4: 4176-4181
 4. Teymourian, H., Salimi, A., Khezrian, S., "Fe₃O₄ magnetic nanoparticles/reduced graphene oxide nanosheets as a novel electrochemical and bioelectrochemical sensing platform". Biosensors and Bioelectronics. 2013; 49: 1–8
 5. Khaloo, S. S., Mozaffari S., Barekat, A., Karimi, F. "Fabrication of a modified electrode based on multi-walled carbon nanotubes decorated with iron oxide nanoparticles for the determination of enrofloxacin". Browse Journals & Magazines IET Micro & Nano Letters. 2015; 10.
 6. Schef, K.A., Ciccocioppo, R., Pohanica, M., Rimarova, K., Opatrilova, R., Rodrigo, L., Kruzliak, P, "Biosensors for the Diagnosis of Celiac Disease: Current Status and Future Perspectives". Mol Biotechmol, 2016, 58: 381
 7. Rodrigo, L., Peña, A. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. 1^o Edición. Barcelona: Editorial Omnia Science, 2013: 45-60.

-
- 8.** Polanco Allúe, I., “¿Qué es la Enfermedad Celíaca?” En: Polanco Allúe, I., Polanco Allúe, I., Consejería de Sanidad de la Comunidad. Libro Blanco de la Enfermedad Celíaca. Madrid: Editorial ICM; 2011. 7-17

 - 9.** Gómez-González, A. “Notas Breves sobre Alimentación en la Enfermedad Celíaca”. Bol. Clin. Hosp. Infant. 2007, 24 (2): 81-83

 - 10.** Parada, A., Araya, M. “El Gluten. Su historia y efectos en la Enfermedad CelíacaRevista”. Rev. Méd. Chile. 2010, 138 (10): 1319-1325

 - 11.** Denery-Papini, S., Nicolas, Y., Pupineau, Y. “Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-Free Food”. Journal of Cereal Science. 1999; 30: 121-131

 - 12.** Fernández, F., Jorge, R. “Desarrollo de cuatro Sistemas de PCR Cuantitativa en Tiempo-Real para la Cuantificación y Caracterización de ADN de Trigo, de Cebada y de Centeno en alimento “Sin Gluten” para Celíacos: Nuevas Técnicas en la Análítica del Gluten”. Trabajo para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química-Física Aplicada, Madrid, 2007.

 - 13.** Wieser, H. “Chemistry of gluten proteins”. Food Microbiology. 2007; (24):115–119.

 - 14.** Meirinho, S. “Aplicação de um sistema de multi-sensores para a detecção de gliadinas: discriminação semi-quantitativa entre alimentos com glúten e sem glúten”. Tesis para optar por el Título de Máster Calidad y Seguridad Alimentaria. Instituto Politécnico de Bragança. 2009.

-
- 15.** P.R. Shewry, Y. Popineau, D. Lafiandra, P. Belton, Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology*. 2001; (11): 433-441.
- 16.** S. Denery-Papini, Y. Nicolas and Y. Popineau, Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-free Foods, *Journal of Cereal Science*. 1999; (30): 121–131.
- 17.** L. De Stefano, M. Rossi, M. Staiano, G. Mamone, A. Parracino, L. Rotiroti, I. Rendina, M. Rossi, S. D'Auria, Glutamine-Binding Protein from *Escherichia coli* Specifically Binds a Wheat Gliadin Peptide Allowing the Design of a New Porous Silicon-Based Optical Biosensor, *J. Proteome Res*. 2006; (5): 1241-1245.
- 18.** P. Ferranti, G. Mamone, G. Picariello, F. Addeo, Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease, *J. Mass Spectrom*. 2007; (42): 1531–1548.
- 19.** J.A. Bietz, High Performance Liquid Chromatography: How protein look in cereals, *Cereal Chem*. 1985; (65): 201-212.
- 20.** V.V. Doña, C.A. Fossati, F.G. Chirido, Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis, *Eur. Food Res. Technol*. 2008; (226): 591–602.
- 21.** K. Dong, C.Y. Hao, A.L. Wang, M.H. Cai, Y.M. Yan, Characterization of HMW Glutenin Subunits in Bread and Tetraploid Wheats by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Cereal Research Communications*. 2009 (26): 65– 72.

-
- 22.** González, J.M., García, E., Fernández, J.L., Gago, L., Benito, T. “Técnicas Analíticas para la detección de gluten en Alimentos”. Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid. 2007.
- 23.** Nassef, H. M.; Bermudo Redond, M. C.; Ciclitira, P. J.; Ellis, H. J.; Fragoso, A.; Osullivan, C. K. “Electrochemical immunosensor for Detection of Celiac disease toxic gliadin in foodstuff”. *Anal. Chem.* 2008, 80: 9265-9277.
- 24.** Chiriaco, M.S., de Feo, F., Primiceri, E., Monteduro, A. G., de Benedetto, E., Pennetta, A., Rinaldi, R., Maruccio, G. “Portable gliadin-immunochip for contamination control on the food production chain”. *Talanta.* 2015, 142: 57-63.
- 25.** Martín, B. “Determinación indirecta de gluten mediante métodos básicos de detección de ADN: PCR y genosensores electroquímicos”. Trabajo para optar por el Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica. Madrid, 2015.
- 26.** González, S. “Reconocimiento molecular mediante aptámeros de péptidos inmunotóxicos de Gluten”. Trabajo para optar por el grado de máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo. Centro Internacional de Postgrado. 2015.
- 27.** Martín, B. “Determinación indirecta de gluten mediante métodos básicos de detección de ADN: PCR y genosensores electroquímicos”. Trabajo para optar por el Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica. Madrid, 2015.

-
- 28.** Mustorp, S.; Dromtorp, S.; Holck, A. "Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2011, 54 (20); 5232-5234.
- 29.** Joseph, M. H.; Davies, P. "Electrochemical Activity of o-Phthalaldehyde-Mercaptoethanol Derivates of Aminoacids. Application to High-Performance Liquid Chromatographic of Aminoacids in Plasma and other Biological Materials. *Journal of Chromatography*. 1983; 277: 125-126
- 30.** Eksin, E., Congur, G., Erden, A. "Electrochemical assay for determination of gluten in flour samples". *Food Chemistry*. 2015; 184: 183-187.
- 31.** Palaniselvam, T.; Kashyap, V.; Bhange, S. N.; Baek, J.-B.; Kurungot, S., "Nanoporous Graphene Enriched with Fe/Co-N Active Sites as a Promising Oxygen Reduction Electrocatalyst for Anion Exchange Membrane Fuel Cells". *Adv. Funct. Mater.* 2016, 23: 2150-2162.
- 32.** Han, T. H., Huang, Y. K., Tan, T., David, V.D. Huang, J. "Steam etched porous graphene oxide network for chemical sensing". *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133: 15264-15267.
- 33.** Li, G., Huo, H., Xu, C. Ni_{0.31}Co_{0.64}S₂ Nanoparticles uniformly anchored on a porous reduced graphene oxidized framework for a high performance non enzymatic glucose sensor. *J. Mater. Chem. A*. 2015, 3: 4922.
- 34.** Chen, D., Feny, H. Li, J. "Graphene oxide: preparation, functionalization and Electrochemical applications". *Chem. Rev.* 2012, 112: 6027-6053.

-
- 35.** Ambrossi, A, Chua, C., Latiff, N., Loo, A., Wong, C., Eng, A. Bonannia, A. Pumera, M. "Graphene and its Electrochemistry-an update". Chem. Soc. Rev. 2016, 45: 2485-2493.
- 36.** Torres-Silva H.;López-Bonilla L. "Aspectos Quirales del Grafeno". Ingeniare. Revista chilena de ingeniería.2011; 9 (1): 67-75
- 37.** Chekin, F. Singh, S., Vasilescu, A. Dhavale, V., Kurungot, S., Boukherroub, R., Szunerits, S. "Reduced Graphene oxide modified electrodes for sensitive sensing of Gliadin in food samples". ACS Daragon Plus Environment. 2016.
- 38.** Shipway, A. N.; Katz, E.; Willner, I. "Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications". CHEMPHYSCHEM. 2000; 1: 18-52
- 39.** De Lamo, B. "Obtención y caracterización de nanopartículas de oro a partir de mostos". Grado en Ingeniería Química. Universidad de Valladolid. Escuela de Ingeniería Industriales. 2015
- 40.** Luo, J., Jing, S., Zhang, H., Jiang, J., Liu, X. A novel non-enzimatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified grapheme sheets electrode. Analytica Chimica Acta. 2012; 709: 47-55
- 41.** Congaleves, G., Marques, P., Vila, M. Hybrid Graphene Metallic Nanoparticles for Biodetection. New Paradigms. Universidad de Aveiro. Portugal. 2016: 77-78
- 42.** Staiano, M.; Matveva, E. G.; Rossi, M.; Crescenzo, R.; Gryczynski, Z.; Gryczynski, I.; Iozzino, L.; Akopova, I.; D'Áuria, S. "Nanostructured Silver-Based Surfaces: New

Emergent Methodologies for an Easy Detection of Analytes. *APPLIED Materials & Interfaces*. 2009; 1 (12): 2909-2916.

43. Chu, P.T.; Lin, C. S.; Chen, W. J.; Chen, C.F.; Wen, H. W. "Detection of Gliadin in Foods Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor That Incorporates Gold Nanoparticles". *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 6483–6492

44. Baeza, A., García, A. "Principio de Química Analítica. Colección de Documentos de Apoyo". Universidad Nacional Autónoma de México, 2011. [Consultado: el 01 mar 2017] Disponible en: depa.fquim.unam.mx/

45. Wang, J. "Analytical Electrochemistry". 2° Edición. New York. Jhon Wiley & Sons, INC, 2001.

46. Bard, A. J., Faulkner, L. R.. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2° Edición. Jhon Wiley & Sons, INC, 2001.

47. Cano Luna, M. "Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras". Trabajo para optar por el Título de Doctor en Ciencias Químicas. Universidad de Córdoba. Departamento de Química, Física y Termodinámica Aplicada. Córdoba, 2008.

48. Martínez, Y., Hernández, R., Ortiz, R. "Prácticas de Electroquímica. Parte II. Voltamperometría". Guía Práctica de la Universidad de Los Andes. Mérida, 2006. [Consultado el 09 Mar 2017]. Disponible en: www.webdelprofesor.ula.ve/ciens/rmhr/index-archivos/GuiaIV2.pdf

-
- 49.** Martínez, Y.; Hernández, R. “Electroquímica: Energía y Ambiente”. 1° Edición. Universidad de los Andes-VII Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química, 2004.
- 50.** Baeza, A., García, A. “Principio de Química Analítica. Colección de Documentos de Apoyo”. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011. [Consultado: el 01 mar 2017] Disponice en: depa.fquim.unam.mx/
- 51.** García, H. M. “Electroforesis en Geles de Poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia”. UNIV DIAG 2000; 1 (2): 31-41
- 52.** Chávez Planes MA, Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana, 1990
- 53.** López de la Mora DA, Sandoval Rodríguez AS. Electroforesis. En: Salazar Montes AM, Sandoval Rodríguez AS, Armendáriz Borunda JS. Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 2º Edición. Mexico DF: McGraw-Hill/Interamericana; 2013:117-26.
- 54.** Cuadro, A.; Casañas R., San Martín, E., Yañes, F. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 8(4): 2014.
- 55.** Kaszuba, M.; McKnight, D.; Connah, M.; McNeil, F.; Nobbmann, U. “Measuring sub nanometer size using dynamic light scattering” Journal of nanoparticle Research. 2008; 10: 823-829.
- 56.** Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. Principios de Análisis Instrumental. Sexta Edición. México. Cengage Learning Editores, 2008.

-
- 57.** Cruz, D.A.; Rodríguez, M.C.; López, J.M.; Herrera, V. M.; Orive, A. G.; Creus, A.H. “Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda”. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 2012: 67-78.
- 58.** De Lamo, B. “Obtención y caracterización de nanopartículas de oro a partir de mostos”. *Grado en Ingeniería Química. Universidad de Valladolid. Escuela de Ingeniería Industriales*. 2015.
- 59.** Jenkins, R.; Snyder R. “Introduction to X-Ray powder diffractometry”. Jhon Wiley and Sons, Inc., USA, 1996.
- 60.** Kittel, C. “Introduction to Solid State Physics. Octava Edición. Wiley. 2004.
- 61.** Soriano Romero, O. “Obtención y Caracterización Espectroscópica de un Compuesto de Cobre”. Tesis para optar al grado de Licenciado en Química. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Físico Matemáticas. 2015
- 62.** Aquino, P. “Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de zinc obtenidas por el método de precipitación para su aplicación en pintura de esmalte comercial”. Tesis para optar al Grado de Profesional Químico. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química. Lima Perú. 2016
- 63.** Goldstein, J.I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Fiori, C.; Lifshin, E. “Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis”. Plenum Press. Primera. Edición. New York. 1981.

-
- 64.** Dupont, F. M.; Chan, R.; Lopez, R.; Vensel, V. H.. “Sequential Extraction and Quantitative Recovery of Gliadins, Glutenins, and Other Proteins from Small Samples of Wheat Flour. *Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1575-1584
- 65.** van Eckert, R.; Berghofer, E.; Ciclitira, P.J; Chirido, F.; Denery-Papini, S.; Ellis, H.J.; Ferranti, P.; Goodwin, P.; Immer, U.; Mamone; Méndez, G.E.; Mothes, T.; Novalin, S.; Osman, A.; Rumbo, M.; Stern, M.; Thorell, L.; Whim, A.; Wieser, H. “Towards a new gliadin reference material–isolation and characterization” . *Journal of Cereal Science.* 2006; 3:331–341
- 66.** Hamra, A.A.B; Lima, H.N; Chee, W.K.; Huang, H.M. “Electro-exfoliating graphene from graphite for direct fabrication of supercapacitor”. *Applied Surface Science.* 2016, 360: 213–223
- 67.** He, H. ; Klinowski, J.; Forster, M.; Lerf A. “A new structural model for graphite oxide”. *Chem Phys Lett* 1998; 287 (1-2): 53-6.
- 68.** Rozada, R. “Grafenos Procesables en Fase Líquida con Características Optimizadas Mediante el Control Microscópico de su Estructura” 2015. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- 69.** Wyckoff, R.W.G. “Crystal Structures 1”. Second edition. New York, New York. Interscience Publishers. 1963: 7-83
- 70.** Pourbaix, M. “Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions”. 1° Edición. Oxford. Editorial Pergamon Press Ltd. 1966.

-
71. Delahay, P.; Pourbaix, M.; Van Rysselberghe, P. "Potential-pH diagrams". *J. Chem. Educ.* 1950; 27 (12): 683
72. Lyon, J; Fleming, D.A.; Stone, M.; Schiffer, P.; Williams, M.E. "Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine" *Nano Lett.* 2004, 4 (4): 719–723.
73. Mahdavi, M.; Namvar, F.; Bin Ahmad, M.; Mohamad, R. "Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract". *Molecules.* 2013. 18(5): 5954-5964.
74. Beltran, J.C. "Synthesis and Characterization of Fe₃O₄/ZnO and Fe₃O₄/ZnMnS Core-Shell Heterostructured Nanoparticles" Trabajo para optar por el grado de Master en Física.. Universidad de Puerto Rico Mayagüez. 2010.
75. Kaushika, A.; Khana, R.; Solanki, P.; Pandeya, P.; Alamb, J.; Ahmadb, S.B.D; Malhotraa. "Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor". *Biosensors and Bioelectronics.* 2008. 24: 676–683.
76. Dung Dang, T.M.; Thu Le, T.T.; Fribourg-Blanc, E.; Chien Dang, M. "Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method". *Nanosci. Nanotechnol.* 2011; 2.
77. "Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*". Trepiana, D. A.; Trabajo para optar al título de Cirujano-Dentista. Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas. Chile. 2015.

-
- 78.** Malea, K.B.; Hrapovic, S.; Liu, Y.; Wang, D.; Luonga, J. "Electrochemical detection of carbohydrates using copper nanoparticles and carbon nanotubes". *Analytica Chimica Acta*. 2004; 516: 35–41.
- 79.** Muralikrishna, S.; Sureshkumar, K.; Yan, Z.; Fernandez, C.; Ramakrishnappa, T. "Non-Enzymatic Amperometric Determination of Glucose by CuO Nanobelt Graphene Composite Modified Glassy Carbon Electrode". *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. 26 (8): 1632-1641.
- 80.** Amor, O. "Sensor Enzimático de Papel. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas". Trabajo para optar al título de Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo. 2015
- 81.** Scheurell, S.; Scholz, F.; Olesch, T.; Kemnitz, E. "Electrochemical evidence for $\text{Cu}^{3+}\text{-Cu}^{2+}\text{-Cu}^+$ transitions in the orthorhombic $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ Phase". *Supercond. Sci. Technol.* 1632. 5 (5).
- 82.** Muralikrishna, S.; Sureshkumar, K.; Yan, Z.; Fernandez, C.; Ramakrishnappa, T. "Non-Enzymatic Amperometric Determination of Glucose by CuO Nanobelt Graphene Composite Modified Glassy Carbon Electrode". *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. 26 (8)1632-1641.
- 83.** Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A.J.; Smyth, M.R. *Electroanalysis*. "Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors". 2006; 8(4): 319–326.
- 84.** Miller, J. N.; Miller, J. C. "Estadística y Quimiometría para Química Analítica" 4ª Edición. Madrid. Editorial Prentice Hall. 2002.

-
- 85** . Nassef, H. M.; Civit, L.; Fragoso, A.; OSullivan, C. K.. “Amperometric Immunosensor for Detection of Celiac Disease Toxic Gliadin Based on Fab Fragments”. *Anal. Chem.* 2009; *81*: 5299–5307.
- 86** . Chu, P. T.; Wen, H. W. “Sensitive detection and quantification of gliadin contamination in gluten-free food with immunomagnetic beads based liposomal fluorescence Immunoassay”. *Anal. Chim. Acta* 2013; *787*: 246–253.
- 87**. Chu, P. T.; Lin, C. S.; Chen, W. J.; Chen, C. F.; Wen, H. W. “Detection of gliadin in foods using a quartz crystal microbalance biosensor that incorporates gold nanoparticles”. *J. Agric. Food. Chem.* 2012; *60*: 6483–6492.
- 88**. Pinto, A.; Nadal-Polo, P.; Henry, O.; Bermudo-Redondo, M. C.; Svobodova, M.; O’Sullivan, C. K. “Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR”. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; *406*: 515–524.
- 89**. Orozco, J.C. “Composición del inóculo (Lb. plantarum, Lb. sreis y Lb. sanfranciscensis) y su efecto en las propiedades viscoelásticas de las masas agrias”. Tesis para obtener el grado de Maestría en Tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional. 2009.