



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

*“MATERIALES VÍTREOS MODIFICADOS PARA APLICACIONES
ANALÍTICAS EN ALIMENTOS DE ORIGEN AGROPECUARIO”*

Ingeniera Zoratti Marianela

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2024

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2018 y 1 de abril de 2024, bajo la dirección de las Dras. Marisa Alejandra Frechero y María Eugenia Centurión.



.....
Ingeniera Marianela Zoratti

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p>
<p>La presente Tesis ha sido aprobada el 30/07/2024, mereciendo la calificación de 10 (sobresaliente)</p>	

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.



Dra. Marisa A. Frechero



Dra. María E. Centurión

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONICET, por la beca de investigación otorgada y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) y su Departamento de Química por brindarme las instalaciones y los recursos necesarios para poder desarrollar esta tesis doctoral. También agradezco la amabilidad del plantel administrativo del Dpto de Química y de INQUISUR (Vero, Flor y Gise).

Gracias a mis directoras de tesis, Dras. Marisa A. Frechero y María E. Centurión por abrirme las puertas en sus grupos de investigación y por los conocimientos transmitidos. Agradezco enormemente a María que, con mucho amor, siempre me dio fuerzas para seguir, gracias por tu ayuda constante, solidaridad, paciencia y contención no solo académica sino personal a lo largo de todos estos años.

A las Dras. María Susana Di Nezio, Valeria Springer, Mariana Reinoso y al Dr. Marcelo F. Pistonesi por acompañarme en todo este camino con sus conocimientos, sus palabras de aliento, cariño y apoyo constante.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Gabriela Krepper por brindarme sus conocimientos tan amablemente, por motivarme y por estar presente en cada momento de dificultad no solo académico sino en lo personal.

Doy gracias al Dr. Fernando Garay por brindarme un espacio en su grupo de investigación en Córdoba, por su cariño, dedicación, paciencia y generosidad.

Gracias a la Dra. Sonia Farenzena y a todos los miembros del grupo de investigación del área de química analítica con los cuales compartí laboratorio y oficina estos casi 6 años, gracias por los hermosos momentos compartidos de risas y charlas, y por generar un agradable ambiente laboral.

Quiero agradecer a todos los integrantes del grupo de investigación LAMAP (IPQA-CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, del cual me sentí parte el primer día, gracias por acompañarme los últimos meses de tesis y brindarme actualmente, un hermoso lugar de trabajo.

En especial, dedico esta tesis a mi mamá y a mis amigas/os fuera del ámbito académico que son mis grandes pilares en esta vida.

Muchas gracias a todos/as.

Con amor, Mane.

RESUMEN

En la actualidad, los mercados exigen la producción de productos agropecuarios con una calidad organoléptica e higiénico-sanitaria cada vez mayor. Algunas de las técnicas usualmente empleadas para el control de calidad de alimentos son costosas, consumen gran cantidad de reactivos y otras generalmente requieren procedimientos de extracción que generan grandes cantidades de residuos que deben ser tratados. Por ello, el desarrollo de nuevos métodos que utilicen sistemas y/o microsistemas analíticos simples, rápidos y de bajo costo es de sumo interés.

Este trabajo de Tesis Doctoral está orientado a la síntesis y caracterización de nuevos materiales vítreos modificados para ser utilizados en el desarrollo de sistemas analíticos que permitan detectar y/o cuantificar diferentes sustancias de interés en matrices agropecuarias.

En una primera instancia, se sintetizó un nuevo material a base de óxidos de molibdeno, vanadio, litio y boro para ser utilizado como electrodo de trabajo en técnicas electroanalíticas. La síntesis de estos electrodos resultó ser sencilla, rápida y de bajo costo. La superficie del electrodo así generada no requiere pretratamientos para su utilización. Se estudió su comportamiento electroquímico mediante Voltamperometría Cíclica, empleando la cupla redox de ferrocianuro de potasio. Se utilizó este nuevo electrodo de trabajo para la determinación de hierro en muestras de leche en polvo fortificadas, empleando Voltamperometría de Onda Cuadrada. Los resultados obtenidos con este método fueron validados mediante el empleo de la técnica ICP-AES mostrando una buena concordancia entre ambos.

Como segundo trabajo de Tesis, se procedió a la determinación de azúcares reductores en muestras de miel, desarrollando un sensor químico espectrofotométrico. Para esto, se sintetizó un nuevo material a base de óxidos de molibdeno, sodio y boro. Se usó un diseño de experimento de tipo Box-Behnken, con el fin de optimizar los parámetros de síntesis del nuevo material. Los valores obtenidos fueron validados empleando el método de Fehling-Causse-Bonnans, obteniéndose resultados satisfactorios.

Por otro lado, se diseñó y fabricó en el laboratorio un biosensor visual que permite realizar medidas de screening para la detección de glucosa en muestras de miel, trabajando a temperatura ambiente. Para esto, se empleó como sustrato un material vítreo particulado comercial a base de sílice. El biosensor se diseñó empleando un nuevo procedimiento para anclar glucosa oxidasa.

Finalmente, se diseñó un biosensor tipo sándwich empleando un electrodo de carbono vítreo comercial, modificado con un hidrogel (quitosano y mucina) en presencia de la enzima tirosinasa. Este biosensor permitió la determinación de polifenoles oxidables totales por cronoamperometría en muestras de yerba mate, té negro y té verde comerciales. Este trabajo fue desarrollado en la Universidad Nacional de Córdoba durante seis meses, en el marco de una pasantía de investigación para jóvenes docentes otorgada por la Universidad Nacional del Sur.

Los métodos propuestos son sencillos, rápidos, de bajo costo y con baja generación de residuos, siendo una buena alternativa respecto a las normativas vigentes para la determinación de analitos (hierro, glucosa y fenoles) en productos agropecuarios.

ABSTRACT

Currently, markets demand the production of agricultural products with increasingly greater organoleptic and hygienic-sanitary quality. Some of the techniques usually used for food quality control are expensive, consume a large amount of reagents, and others generally require extraction procedures that generate large amounts of waste that must be treated. Therefore, the development of new methods that use simple, fast and low-cost analytical systems and/or microsystems is of great interest.

This Doctoral Thesis work is based on the synthesis and characterization of new modified glass materials to be used in the development of analytical microsystems that allow detecting and/or quantifying different substances of interest in agricultural matrices.

In the first instance, a new material was synthesized based on molybdenum, vanadium, lithium and boron oxides to be used as a working electrode in electroanalytical techniques. The synthesis of these electrodes is simple, fast and low cost. The resulting electrode surface does not require any pretreatment before use. Its electrochemical behavior was studied by Cyclic Voltammetry, using the redox couple of potassium ferrocyanide. This new working electrode was used for the determination of iron in fortified milk powder samples, using Square Wave Voltammetry. The results obtained with this method were validated by using the ICP-AES technique, showing good agreement between both.

On the other hand, the determination of reducing sugars in honey samples was carried out, developing a spectrophotometric chemical sensor. For this purpose, a new material was synthesized based on molybdenum, sodium and boron oxides. A Box-Behnken experimental design was used in order to optimize the synthesis parameters of the new material. The values obtained were validated using the Fehling-Causse-Bonnans method, obtaining satisfactory results.

A visual biosensor was designed and fabricated in the laboratory to allow screening measurements for the detection of glucose in honey samples, working at room temperature. A commercially available silica-based particulate vitreous material was used as the substrate. The biosensor was designed using a novel procedure for anchoring glucose oxidase.

Finally, a sandwich biosensor was developed using a commercial glassy carbon electrode modified with a hydrogel (chitosan and mucin) in the presence of the enzyme tyrosinase. This biosensor allowed the determination of total oxidizable polyphenols by chronoamperometry in samples of commercial yerba mate, black tea and green tea. This work was developed at the Universidad Nacional de Córdoba for six months, within the framework of a research internship for young teachers granted by the Universidad Nacional del Sur.

The proposed methods are simple, fast, low-cost and with low waste generation, being a good alternative to current regulations for the determination of analytes (iron, glucose and phenols) in agricultural products.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Alimentos de origen agropecuario	13
1.1.1. Miel	13
1.1.2. Leche	14
1.1.3. Yerba mate.....	15
1.1.4. Té verde y té negro	16
1.2. Producción de alimentos agropecuarios	16
1.3. Sensores químicos	17
1.3.1. Clasificación general de sensores	18
1.3.2. Sensores químicos con transducción óptica y electroquímica	19
1.3.3. Biosensores con transducción óptica y electroquímica.....	20
1.4. Materiales para la fabricación de sensores	22
1.4.1. Materiales vítreos	22
1.4.1.1. Aplicaciones de materiales vítreos en sensores.....	24
1.5. Bibliografía.....	26

CAPÍTULO 2. OBJETIVO GENERAL

2. Objetivo general.....	30
---------------------------------	-----------

CAPÍTULO 3. SENSORES QUÍMICOS

CAPÍTULO 3.1. Sensor voltamperométrico basado en una matriz vítrea de borato para la determinación de hierro en leche en polvo fortificada

3.1.1. Objetivo	33
3.1.2. Introducción	33
3.1.3. Materiales y métodos.....	34
3.1.3.1. Reactivos y soluciones	34
3.1.3.2. Muestras	35
3.1.3.3. Instrumentación.....	36
3.1.3.4. Preparación del electrodo de trabajo MLBG/V/CNPs.....	37
3.1.3.5. Preparación del material y electrodo MLBG.....	37
3.1.3.6. Preparación del material y electrodo MLBG2/V	38
3.1.3.7. Síntesis de nanopartículas de carbono para la modificación del electrodo MLBG2/V	38
3.1.3.8. Mediciones voltamperométricas	39
3.1.4. Resultados y discusión	40
3.1.4.1. Caracterización de los materiales sintetizados	40
3.1.4.1.1. Caracterización de electrodos MLBG	41

3.1.4.1.2. Caracterización del electrodo MLBG2/V.....	43
3.1.4.1.3. Caracterización del electrodo MLBG2/V/CNPs3	44
3.1.4.2. Aplicaciones analíticas	46
3.1.4.2.1. Optimización de parámetros de voltamperometría de onda cuadrada (SWV).....	47
3.1.4.2.2. Parámetros analíticos	49
3.1.4.2.3. Aplicación a muestras de leche en polvo fortificada	51
3.1.5. Conclusiones parciales	52
3.1.6. Bibliografía	53
CAPÍTULO 3.2. Sensor óptico basado en una matriz vítrea de óxidos de molibdeno, sodio y boro para la determinación rápida de azúcares reductores en muestras de miel	
3.2.1. Objetivo	58
3.2.2. Introducción	58
3.2.3. Materiales y métodos.....	59
3.2.3.1. Reactivos y soluciones	59
3.2.3.2. Instrumentación.....	60
3.2.3.3. Síntesis del material vítreo MNB.....	61
3.2.3.3.1. Síntesis de los materiales MNB-C y MNB-C/Seco.....	61
3.2.4. Resultados y discusión	62
3.2.4.1. Caracterización del material	62
3.2.4.1.1. Efecto Tyndall	62
3.2.4.1.2. Caracterización del comportamiento del vidrio con la temperatura.....	63
3.2.4.1.3. Microscopía de barrido electrónico (SEM).....	65
3.2.4.1.4. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	65
3.2.4.1.5. Potencial zeta y tamaño hidrodinámico	66
3.2.4.1.6. Difracción de rayos X (XRD)	67
3.2.4.2. Procedimiento	68
3.2.4.3. Optimización de las variables de preparación del sensor	69
3.2.4.4. Propiedades analíticas del método propuesto	73
3.2.4.5. Aplicación a muestras reales.....	74
3.2.5. Conclusiones parciales	75
3.2.6. Bibliografía	76
CAPÍTULO 4. BIOSENSORES	
CAPÍTULO 4.1. Biosensor visual basado en micropartículas vítreas de silicato comercial para la detección de glucosa	
4.1.1. Objetivo	82

4.1.2. Introducción	82
4.1.3. Materiales y métodos	84
4.1.3.1. Reactivos y soluciones	84
4.1.3.2. Instrumentación.....	85
4.1.3.3. Procedimiento para el desarrollo del sensor visual	85
4.1.4. Resultados y discusión	87
4.1.4.1. Caracterización de los materiales vítreos	87
4.1.4.1.1. Espectroscopía FTIR	87
4.1.4.1.2. Difracción de rayos X.....	88
4.1.4.1.3. Potencial zeta y tamaño hidrodinámico	89
4.1.4.2. Mecanismo de fijación al sustrato.....	90
4.1.4.3. Evaluación del desempeño del sensor visual	91
4.1.5. Conclusiones parciales	94
4.1.6. Bibliografía	95
CAPÍTULO 4.2. Desarrollo de un biosensor cronoamperométrico basado en un electrodo comercial de carbono vítreo, modificado con una matriz de hidrogel, para la determinación de compuestos fenólicos en té y yerba mate	
4.2.1. Objetivo	98
4.2.2. Introducción	98
4.2.3. Materiales y métodos	100
4.2.3.1. Reactivos y soluciones	100
4.2.3.2. Instrumentación.....	101
4.2.3.3. Preparación de muestras.....	102
4.2.3.4. Preparación de la matriz enzimática	103
4.2.3.5. Construcción del biosensor	104
4.2.3.6. Medidas cronoamperométricas.....	105
4.2.4. Resultados y discusión	105
4.2.4.1. Estudio electroquímico de catecol	105
4.2.4.2. Optimización de la matriz enzimática.....	107
4.2.4.3. Verificación del efecto de la enzima.....	111
4.2.4.4. Determinación de los parámetros analíticos para el biosensor optimizado	111
4.2.4.5. Análisis de FOT en muestras reales	114
4.2.5. Conclusiones parciales	117
4.2.6. Bibliografía	118
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES	
5. Conclusiones generales	122

APÉNDICE

A.1. PRODUCTIVIDAD	124
A.1.1. Publicaciones en revistas científicas	124
A.1.2. Presentaciones en congresos y reuniones científicas	124
A.2. BECAS OBTENIDAS.....	127

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Alimentos de origen agropecuario

En Argentina, décimo exportador mundial de productos agroalimentarios, se producen alimentos para más de 450 millones de personas (10 veces su población) [1]. La principal provincia productora del país es Buenos Aires con más del 33 % de la superficie agrícola, luego siguen las provincias de Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos. La provincia de Buenos Aires es la principal exportadora de cereales y oleaginosas y también, de producciones hortícolas y ganaderas [2]. Dentro de los principales productos agrícolas de Argentina se destacan los de origen animal como la carne, miel, leche y sus derivados, y de los de origen vegetal como el vino, soja, trigo, maíz, té y yerba mate.

Según un informe de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), los alimentos de origen animal son valiosos porque garantizan la nutrición y la salud humana, aportando proteínas de alto valor biológico, importantes ácidos grasos, vitaminas y minerales [3]. Los alimentos de origen vegetal han sido objeto de gran interés para la búsqueda de compuestos biológicamente activos, a los cuales, se les atribuyen las propiedades beneficiosas de dichos alimentos [4-5].

La agroindustria argentina es uno de los sectores más dinámicos de la economía local y en los próximos años, se presentan desafíos que requieren desarrollar una agricultura resiliente, es decir, una agricultura con suelos fértiles y con una buena estructura, además de plantas fuertes y animales sanos.

En esta Tesis Doctoral se eligen los productos agropecuarios que se detallan en los ítems siguientes. Estos productos son alimentos de consumo diario y son representativos de la economía Argentina.

1.1.1. Miel

En la producción agropecuaria Argentina, la apicultura es una actividad muy importante por su valor económico y también, por su gran valor social y ecológico: la crianza y multiplicación de abejas contribuye con la biodiversidad ambiental y con la producción de alimentos [6].

En nuestro país hay aproximadamente más de 20 mil productores que trabajan con alrededor de 4 millones de colmenas y producen al menos 75 mil toneladas de miel anuales. El 50 % del total de colmenas se ubican principalmente en la provincia de Buenos Aires, un 35 % se reparte entre las provincias de Córdoba, Santa Fe, La Pampa

y Entre Ríos y el 15 % restante se distribuye en el resto del territorio nacional, menos en Tierra del Fuego que no explotan sus colmenas comercialmente [6].

La actividad apícola representa una de las actividades principales para la agricultura familiar y las economías regionales [7]. Cabe señalar que la Argentina es el principal productor de miel de América, seguido por Estados Unidos, México, Brasil, Canadá, Uruguay y Chile. Por otro lado, es el segundo país exportador, después de China y se exporta cerca del 95 % (70.000 toneladas) de la miel que se produce. Sin embargo, el consumo interno es de alrededor de 6.000 toneladas en promedio, bajo en relación a países como Estados Unidos, Alemania y Japón, principales consumidores de la miel argentina exportada.

En el Artículo 782 y 783 (Res. 2256, 16/12/1985) del capítulo X del CAA (Código Alimentario Argentino) [8] se define la miel o miel de abeja, como el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándola en panales, donde madura hasta completar su formación. También se especifica el porcentaje mínimo de azúcares reductores (calculados como azúcar invertido) que debe contener: mín.: 65 % para miel de flores y 60 % para mieles de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores. La miel contiene principalmente hidratos de carbono (75-80 %) de los cuales el 35-40 % corresponde a la fructosa y el 30-35 % a la glucosa, el resto de los azúcares son disacáridos como la sacarosa (aprox. 5-10 %), la maltosa, y el trisacárido melecitosa; también contiene agua 15-20 %, hasta un 0,4 % de proteínas y el resto son minerales y vitaminas; su color varía desde casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada, su sabor y aroma varían, pero en general posee los de la planta de las que procede. El origen floral de la miel es una característica importante en la evaluación de su calidad, ya que los consumidores la estiman según sus características organolépticas, que dependen de su origen botánico y también de su origen geográfico [9].

La miel producida en nuestro país es considerada una de las de mejor calidad en el mundo debido a sus características organolépticas y fisicoquímicas para consumo directo de los mercados más exigentes, por ello, es necesario establecer métodos de control rápidos, simples y económicos.

1.1.2. Leche

Argentina ocupa el noveno puesto a nivel mundial en la producción de leche. La industria láctea del país procesa diariamente 27 millones de litros de leche. Cada año,

se exportan alrededor de 411.000 toneladas de productos lácteos a 69 países. Entre los principales productos de exportación se encuentran la leche en polvo entera y desnatada, el suero en polvo y el queso. La OCDE-FAO prevé un aumento en la producción de lácteos del 23 % y un 40 % para las exportaciones para 2024 [10].

El CAA en el capítulo VIII artículo 553 (Res 33, 13.9.06) designa como alimentos lácteos, a la leche obtenida de vacunos o de otros mamíferos, sus derivados o subproductos, simples o elaborados, destinados a la alimentación humana. En el art 567 define a la leche en polvo como el producto que se obtiene por deshidratación de la leche, entera, descremada o parcialmente descremada y apta para la alimentación humana, mediante procesos tecnológicamente adecuados.

La leche es un líquido de composición y estructura compleja, blanca opaca, de sabor suave, olor característico y con un pH cercano a la neutralidad. La materia grasa se encuentra en emulsión, las proteínas constituyen una suspensión, mientras que los restantes componentes (lactosa, otras sustancias nitrogenadas, minerales, etc.) están disueltos. Dentro de la composición de la leche los minerales representan una pequeña fracción de los sólidos. Su concentración es de aproximadamente 7 a 9 g/kg, es decir alrededor de un 0,7 % de la materia seca de la leche. Esta fracción tiene una gran importancia nutricional y tecnológica, en particular por los aportes de calcio y fósforo. La leche contiene además oligoelementos (zinc, hierro, etc.) cuyas variaciones están asociadas a cambios de alimentación y a aportes externos (contaminación atmosférica, por el material de ordeño).

El artículo 1363 (Res. Con. SPReI 118/2008 y SAGPyA 474/2008) del Capítulo XVII - Alimentos de régimen o dietéticos del CAA define a los alimentos fortificados como aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es mayor al contenido natural medio del alimento, por haber sido suplementado significativamente. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20-50 % para vitaminas liposolubles y minerales, y un 20-100 % para vitaminas hidrosolubles.

1.1.3. Yerba mate

El mate o yerba mate es una de las bebidas más consumidas en América del Sur, principalmente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Argentina es el primer exportador de mate con un consumo de 6,4 kg/persona/año mientras que Uruguay tiene el mayor consumo per cápita de 8 kg/persona/año [11].

El CAA (capítulo XV, artículo 1193) define como yerba mate al producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas y desmenuzadas, de *Ilex paraguariensis*

Saint Hilaire (Aquifoliaceae) exclusivamente, mezcladas o no con fragmentos de ramas secas jóvenes, pecíolos y pedúnculos florales. Un estudio reciente muestra que el principal antioxidante presente en muestras de yerba mate corresponde a derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoles, los que comprenden al 90 % y al 10 % de fenoles presentes en yerba mate, respectivamente [12]. En los últimos 15 años se evidencia un aumento en las investigaciones sobre los beneficios de las propiedades biomédicas del consumo de yerba mate. Por ello, algunos de los beneficios del consumo de yerba mate son sus propiedades antioxidantes, vasodilatadoras y reductoras de lípidos, efectos antimutagénicos y anticancerígenos [13].

1.1.4. Té verde y té negro

El Artículo 1181 del CAA define genéricamente al té, como el producto obtenido del procesamiento conveniente de las yemas, hojas jóvenes, pecíolos y tallos tiernos de la especie *Camellia sinensis* L. En el caso del té negro (o simplemente té) el procesamiento corresponde al marchitado, enrulado, fermentado y secado de las partes cosechadas, mientras que, en el caso del té verde, se omite el proceso de fermentación. Ambos té son ricos en compuestos bioactivos como polifenoles (catequinas, flavonoides, teogalina y ácido gálico) [14]. Las infusiones de té son utilizadas como medicina desde la antigüedad por sus compuestos bioactivos responsables de las propiedades beneficiosas para la salud. Varios estudios epistemológicos evidenciaron que los polifenoles del té poseen acción antialérgica, propiedades antimicrobianas y reducen el riesgo de enfermedades cardíacas y cáncer en humanos [15-17].

1.2. Producción de alimentos agropecuarios

La producción de alimentos agropecuarios es, tradicionalmente, uno de los puntales de la economía argentina. Una producción agrícola de alta calidad logrará que los productos obtenidos tengan competitividad en los mercados nacionales e internacionales. Por lo tanto, la capacidad para entregar un producto de calidad al mercado y a los consumidores requiere excelencia en la producción y en el manejo de éstos. La ingesta de alimentos aporta la energía y los nutrientes que el cuerpo necesita, seguros (es decir, libres de contaminación) para garantizar una correcta calidad de vida. Por ello, la alimentación de los consumidores debe controlarse bajo distintos marcos legales que obligan a la industria agroalimentaria a llevar a cabo un control de calidad y de esta manera, obtener productos agropecuarios con una mayor calidad nutritiva, sensorial e higiénico-sanitaria [18]. El control alimenticio en los laboratorios ha ido

evolucionando de forma casi exponencial en los últimos 30 años, juntamente con el crecimiento del sector industrial agroalimentario. Esto ha exigido una adecuación tecnológica e instrumental sin parangón con ninguna otra época de la historia, lo que se refleja en mayores controles de calidad agroalimentaria, en términos de precisión, fiabilidad o rapidez.

El análisis de los alimentos llevados a cabo en los laboratorios de control debe cumplir con los estándares y normativas vigentes, evitando futuros problemas con los consumidores. Los estándares se establecen en relación con los componentes del producto, el tipo de envase que se ha utilizado, la vida útil requerida, a qué consumidores va dirigido dicho producto, etc. Para asegurar estos estándares, existen diferentes tipos de análisis de alimentos, entre los que destacan los microbiológicos (detección de *Salmonella* y *E. Coli*, entre otros), fisicoquímicos (como metales pesados), nutricionales (proteínas, hidratos de carbono, sal, fibra, grasas), de alérgenos, sensoriales, estudios de vida útil. Estos análisis generalmente se llevan a cabo empleando métodos oficiales que en algunos casos presentan las desventajas de ser laboriosos y emplear mucho tiempo de análisis, gran cantidad de reactivos y muestras, mientras que otros necesitan instrumentos de elevado costo y no son adecuados para aplicaciones in situ. Por otro lado, durante muchos años el análisis de diferentes analitos se llevaba a cabo en laboratorios de control, alejados del sitio de muestreo. Con el avance tecnológico y el desarrollo de nuevas plataformas sensoras, esta dificultad se ha visto mejorada ya que permiten realizar análisis cualitativos (screening) y/o cuantitativos. En la actualidad se tiende al empleo de sistemas analíticos de respuesta rápida, sensibles y específicos, que no requieran en lo posible tratamiento de las muestras, que puedan ser incluidos en sistemas integrados, que sean de fácil automatización, que permitan trabajar en tiempo real, y de bajo costo. Los **sensores químicos** cumplen con estos requisitos asociados a su versatilidad que favorece el diseño de dispositivos para diferentes aplicaciones.

1.3. Sensores químicos

La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define un sensor químico como *un dispositivo que transforma la información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede ser originada a través de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede incluir dispositivos que posean las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos* [19].

Usualmente, los sensores químicos son dispositivos que permiten obtener una respuesta en tiempo real al recibir un estímulo químico, llevando a cabo una transducción directa de una entidad química (gaseosa o líquida) a una señal física [20].

La Figura 1.1. esquematiza las partes principales de un sensor, donde se puede distinguir el receptor, que es el elemento que interactúa selectivamente con el analito de la muestra a analizar y el cual, genera la información química (a partir de una reacción química o un cambio físico producido), por otro lado, el transductor reconoce y transforma esta información en una señal analíticamente medible.

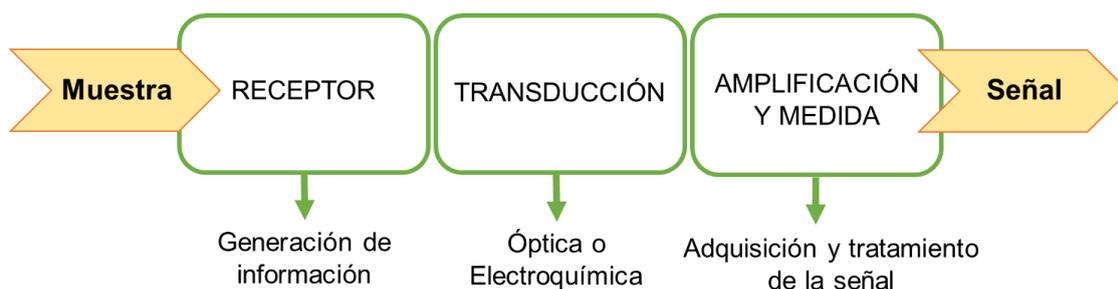


Figura 1.1. Esquema de un sensor y sus componentes principales.

1.3.1. Clasificación general de sensores

Existen numerosos criterios para establecer una clasificación de sensores, sumado al gran interés actual en el desarrollo de plataformas sensoras que permitan realizar controles de forma más rápida y económica. Esto hace que la forma de clasificación de sensores sea dinámica en el tiempo. No obstante, en la Figura 1.2 se presenta una de las clasificaciones que suele emplearse:

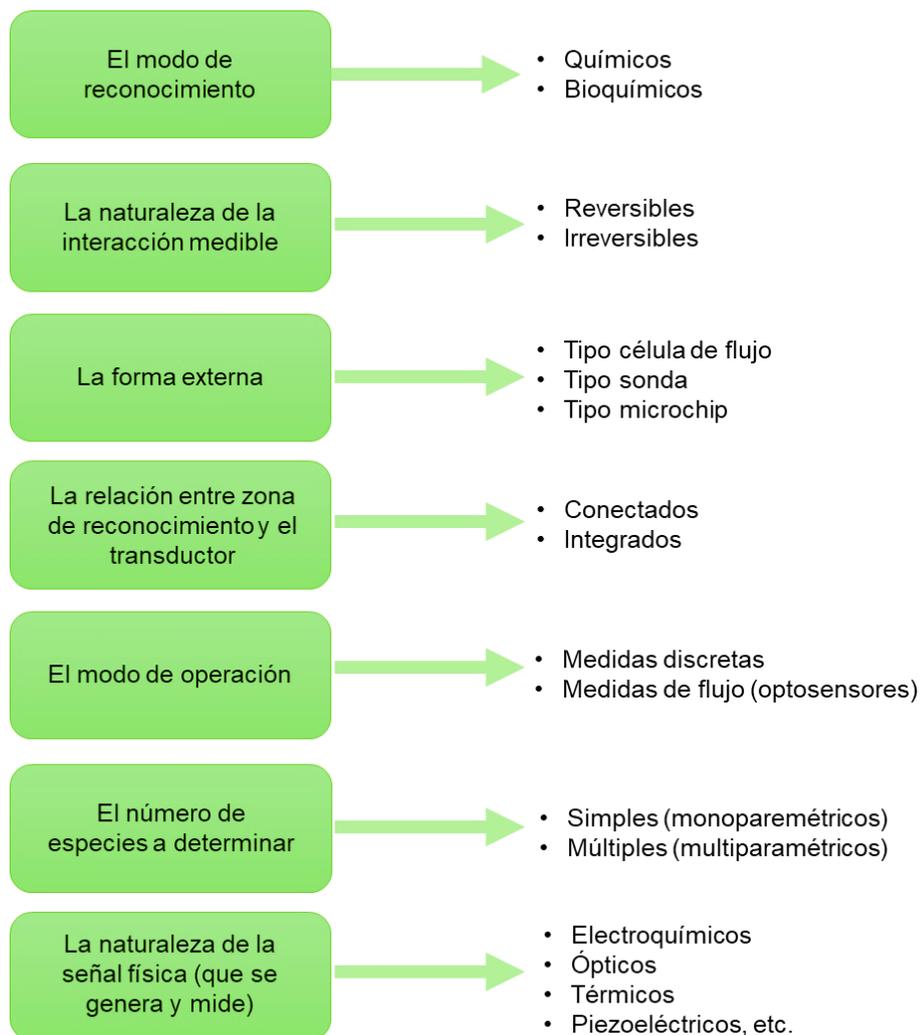


Figura 1.2. Criterios generales para clasificar sensores químicos.

En esta Tesis interesa abordar a los sensores químicos y biosensores ambos, con transducción óptica y/o electroquímica.

1.3.2. Sensores químicos con transducción óptica y electroquímica

En los **sensores ópticos** las interacciones del analito a determinar con la fase sensora producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema que se relacionan con la concentración del analito. Los sensores ópticos se pueden clasificar en función de la naturaleza de la propiedad óptica medida en sensores de: absorbancia/reflectancia (UV-Vis, NIR), luminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia), índice de refracción, dispersión Raman, turbidimetría, polarimetría o espectroscopia fotoacústica, etc.

Los parámetros para definir la calidad de un sensor óptico son principalmente: sensibilidad, selectividad, reversibilidad, tiempo de respuesta, tiempo de vida y reproducibilidad [21].

Por otro lado, los **sensores electroquímicos** miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema y ese cambio producido está relacionado con la concentración del analito. En estos sensores el electrodo es usado como elemento de transducción. Así, se puede mencionar a los sensores voltamperométricos, amperométricos, conductimétricos, potenciométricos, entre otros.

En la Figura 1.3. se muestra un esquema representativo de los sensores químicos ópticos y electroquímicos.

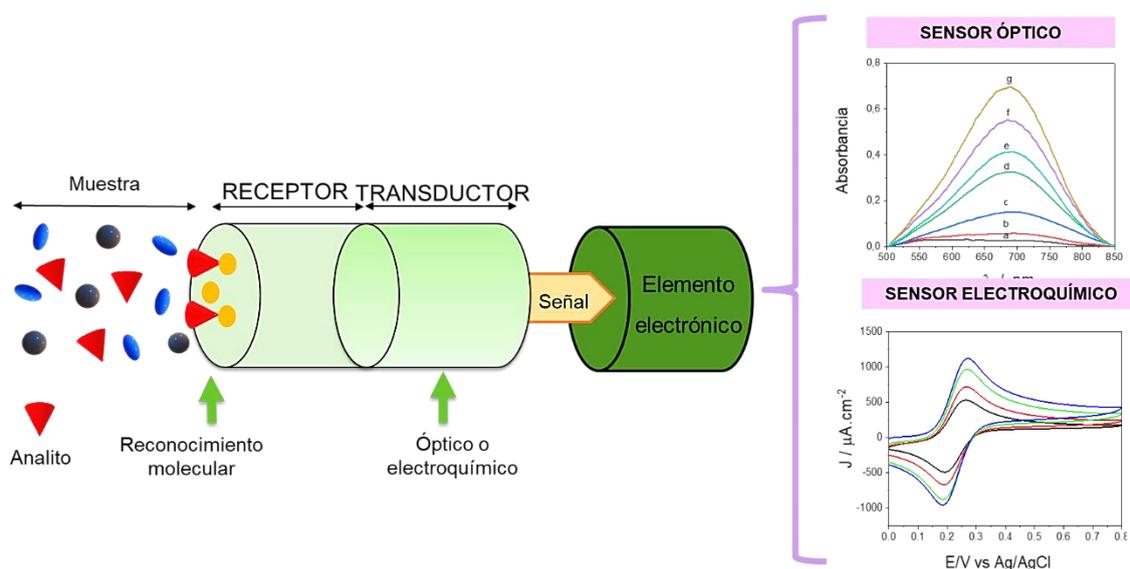


Figura 1.3. Esquema representativo de los sensores químicos ópticos y electroquímicos.

1.3.3. Biosensores con transducción óptica y electroquímica

De acuerdo con la **IUPAC** un biosensor es un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células completas para detectar compuestos químicos, generalmente por señales eléctricas, térmicas y ópticas [22]. Los biosensores forman parte de un subgrupo de sensores químicos que incorporan un elemento de detección biológica [23].

De manera general se puede definir a los biosensores como dispositivos que pueden desarrollarse para monitorear la concentración de analitos en muestras de fluidos biológicos y proporcionar una respuesta rápida con alta especificidad y bajo límite

de detección [24]. Los receptores biológicos (enzima, anticuerpo, tejido, proteína, bacteria, célula, etc.) son elementos de bioreconocimiento que, al estar en contacto directo con el analito de la muestra, genera un cambio que es detectado obteniéndose una señal analítica fácilmente medible.

El diseño y desarrollo de biosensores ha ocupado un lugar central para los investigadores o científicos en la última década debido a la amplia gama de aplicaciones de biosensores, como el cuidado de la salud y el diagnóstico de enfermedades, el monitoreo ambiental, el monitoreo de la calidad del agua, de los alimentos y la administración de medicamentos [25].

Los **biosensores ópticos** son dispositivos analíticos que consisten en un elemento de bioreconocimiento (enzimas, anticuerpos, aptámeros, células enteras y tejidos) integrado en un sistema transductor óptico. Su principio de funcionamiento se basa en generar señales, que son proporcionales a la concentración del analito y proporcionar una detección paralela en tiempo real. En estos biosensores, el proceso de transducción induce un cambio en la absorción, transmisión, reflexión, refracción, fase, amplitud, frecuencia y/o polarización de la luz, en respuesta a cambios físicos o químicos creados por los elementos de bioreconocimiento [25].

Un **biosensor electroquímico** combina el poder analítico de la técnica electroquímica con la especificidad del proceso de reconocimiento biológico. El objetivo es producir biológicamente una señal eléctrica que se relaciona con la concentración de un analito. Para este propósito un reactivo biospecífico es inmovilizado o retenido en un electrodo, convirtiendo la reacción biológica/bioquímica en una respuesta electroquímica [26].

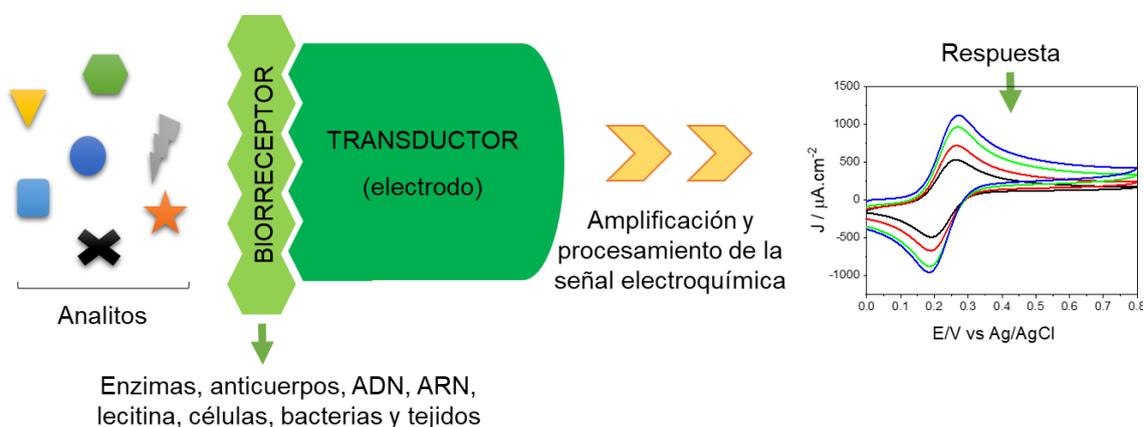


Figura 1.4. Representación esquemática de un biosensor electroquímico con los componentes básicos que lo integran.

En una reacción bioquímica, los sensores amperométricos miden cambios en la corriente debido a la reducción u oxidación de especies electroactivas en la superficie de los electrodos. El potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia se mantiene constante cuando se mide la corriente. Un biosensor conductimétrico funciona según el principio de producción o consumo de especies iónicas durante el proceso metabólico. Implica un cambio en la conductividad eléctrica de la solución electrolítica, que se puede medir [27].

1.4. Materiales para la fabricación de sensores

El desarrollo de nuevos sistemas sensores requiere de estrategias novedosas y multidisciplinarias que permitan la síntesis de nuevos materiales de carácter híbrido con características definidas. De acuerdo con los diferentes componentes de un sensor químico, estos se pueden incorporar y combinar en un mismo dispositivo materiales que, en principio, tienen muy pocos elementos en común. La integración de elementos en un único sistema y la capacidad de transferir y vincular la información entre ellos permite construir dispositivos sumamente novedosos y efectivos.

En esta Tesis se han desarrollado materiales vítreos modificados para ser utilizados como sensores químicos y biosensores con transducción óptica y/o electroquímica.

1.4.1. Materiales vítreos

Los materiales en estado sólido se clasifican en cristalinos, amorfos o semicristalinos. En los cristalinos, los átomos adoptan arreglos ordenados y repetitivos formando estructuras tridimensionales periódicas. En los materiales amorfos se pierde el ordenamiento periódico, tal el caso de los materiales vítreos. La Figura 1.5. (a) es una representación bidimensional de un sólido cristalino. La Figura 1.5. (b) representa el mismo sólido, no cristalino. Por ejemplo, el dióxido de silicio según la velocidad a la que sea enfriado su fundido puede solidificarse en estado cristalino o en estado amorfo [28].

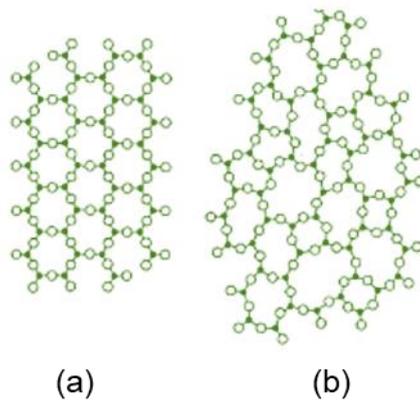


Figura 1.5. Esquema que representa (a) SiO_2 cristalino y (b) SiO_2 amorfo.

Un vidrio es un material natural o artificial que puede obtenerse por enfriamiento a cierta velocidad de una mezcla de componentes fundidos. Mediante diversos métodos de enfriamiento rápido fundido alcanza una amplia variedad de propiedades con múltiples usos en la vida cotidiana, para ser utilizados en construcción, industria, tecnología, investigación, etc [29]. Para obtener un vidrio a partir de un líquido es necesario enfriar rápidamente evitando la formación de cristales.

Este método es sin dudas el método más antiguo de fabricación de vidrios, un proceso tradicional que consiste en la fusión de una mezcla de componentes en concentraciones molares adecuadas, seguida de un enfriamiento rápido el cual produce un aumento de la viscosidad del fluido y por ello, su solidificación. Como el sólido resultante conserva las características desordenadas del fluido, el vidrio puede definirse como un material inorgánico sólido producto de la fusión que se ha enfriado hasta su rigidez sin que se haya producido la cristalización.

El vidrio es un material que sigue liderando la innovación. Los materiales vítreos se han integrado en diversos dispositivos como los dispositivos optoelectrónicos, los dispositivos fotovoltaicos y en aplicaciones de los denominados materiales inteligentes como sensores ambientales, farmacéuticos y médicos, reforzando su influencia como materiales esenciales que brindan nuevas oportunidades de crecimiento para el mercado de diseño [30].

1.4.1.1. Aplicaciones de materiales vítreos en sensores

Nogami *et al.* desarrollaron un sensor de vapor de metanol utilizando películas de vidrio conductoras de protones derivadas de sol-gel y analizaron su actividad electroquímica. Ellos utilizaron una estructura de EMD (dióxido de manganeso electrolítico) como electrodo de referencia. Los resultados indicaron que el sensor puede detectar concentraciones de vapor de metanol entre 0,01 y 2 % en el aire. Las películas de vidrio demostraron buena reproducibilidad y una magnitud de señal que se correlacionó bien con la concentración de gas [31].

Por otro lado, los investigadores Xu *et al.* construyeron un dispositivo colorimétrico para la detección electroquímica en sistemas acuosos y no acuosos mediante el comportamiento electrocrómico del metil viológeno como indicador. Los cambios de color resultantes se capturan con la cámara de un teléfono inteligente resultando un dispositivo de bajo costo y fácil operación. El sensor electrocrómico incluye un portaobjetos de vidrio recubierto de Ti/Pt como electrodo de trabajo (WEa) [32].

El trabajo realizado por Ozmen y colaboradores consistió en preparar un nuevo adsorbente por modificación de perlas de vidrio con glutaraldehído para la remoción de iones de metales pesados en tratamientos de aguas. Las perlas de vidrio se han utilizado como material de soporte debido a su estrecha dispersión de tamaño, resistencia mecánica y bajo costo. Primero realizaron un tratamiento con una solución de 4 M de NaOH y después, modificaron el vidrio con un agente de acoplamiento de silano (3-aminopropil-trietoxisilano (APTES)) y luego, con glutaraldehído al 25 % [33].

Švara Fabjan *et al.* presentaron un novedoso sistema colorimétrico para determinar humedad relativa del ambiente. En este caso, se basa en la disolución de colorantes en agua condensada en capilares de sílice mesoporosa modificada selectivamente. Los niveles altos de humedad del aire interior inducen el crecimiento de moho y algas que representan un riesgo potencial para la salud humana y también tienen un efecto de deterioro en las paredes. Por lo tanto, es altamente deseable la detección simple de humedad localizada especialmente en lugares con poca circulación de aire. Después de la exposición al ambiente de diferente humedad del aire, el tinte se disolvió en agua provocando el cambio de color del adsorbente. Con el uso de adsorbentes de diferentes diámetros de mesoporos se logró una alta capacidad para ajustar el valor de la humedad relativa cuando se produce la condensación capilar completa [34].

Además, se ha reportado el diseño y la preparación de varios vidrios modificados con nanopartículas, por ejemplo, con carbón dots (CD) formando compuestos prefuncionalizados con silano (SiCD), o también, gel nanohíbrido (vidrios SiCD-Gel) y

macroestructuras monolíticas (vidrios 100 % SiCD-Gel). El método implica una preparación en un solo recipiente de SiCD utilizando ácido polibásico orgánico y silanos, posterior hidrólisis y autocondensación o policondensación híbrida con silanos para formar SiCD-Gels. Estos SiCD pueden funcionar tanto en soluciones y matrices sólidas. Los vidrios se pueden gelificar, cortar y pulir fácilmente en diferentes geometrías y tamaños según el diseño y la aplicación de destino, y tienen estabilidades ópticas, térmicas y mecánicas a largo plazo, así como una alta transmisión en la región visible e IR cercana [35].

Se ha demostrado que varios materiales inorgánicos con vidrios de silicato, vitrocerámicos y fosfatos de calcio, son bioactivos y reabsorbibles y exhiben propiedades mecánicas apropiadas que los hacen adecuados para aplicaciones, por ejemplo, en ingeniería de tejidos óseos [36].

Teniendo en consideración el potencial tecnológico de los compuestos vítreos, los mismos fueron elegidos como matrices para el desarrollo de sensores químicos y biosensores novedosos. A continuación, en cada uno de los subsiguientes capítulos se especifica y justifica la elección de las diferentes composiciones químicas de las matrices vítreas elegidas de acuerdo a los objetivos propuestos.

Finalmente, cabe destacar que el desarrollo de la presente Tesis se enmarca dentro del Proyecto Unidad Ejecutora (P-UE 2017), y se llevó a cabo en el ámbito del Departamento de Química e INQUISUR (UNS-CONICET), en el marco de una investigación interdisciplinaria mediante la participación de dos disciplinas Fisicoquímica y Química Analítica, que corresponden a secciones del INQUISUR y las respectivas áreas del Departamento de Química de la UNS.

1.5. Bibliografía

- [1] BÁTIZ M. (2022). "Argentina tiene un papel vital como productora de alimentos". <https://www.telam.com.ar>. (Último acceso: 28/06/2023).
- [2] ESTRATEGIA PROVINCIAL PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO EPSA BUENOS AIRES. Resolución del Ministerio de Desarrollo Agrario N° 281/2023.
- [3] FAO. (2022). Contribution of terrestrial animal source food to healthy diets for improved nutrition and health outcomes: key messages. Rome, Italy. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CC0946EN/> (Último acceso: 5/10/2023)
- [4] Ferrari, A., Vinderola, G., & Weill, R. (2020). Alimentos Fermentados: Microbiología. *Nutrición, Salud y Cultura*.
- [5] García, E. C., & Solís, I. M. (Eds.). (2021). *Manual de fitoterapia*. Elsevier Health Sciences.
- [6] SENASA, [Online] *Miel argentina de alta calidad endulza al mundo*. <http://www.senasa.gob.ar> (Último acceso: 02/07/2023).
- [7] SENASA, [Online] 6/7/2018. *Diez beneficios para la salud por el consumo de miel*. <http://www.senasa.gob.ar> (Último acceso: 28/06/2023).
- [8] CAA, Código Alimentario Argentino. (2023). Capítulo X: Alimentos azucarados. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario> (Último acceso 5/10/2023).
- [9] Baroni, M. V., Nores, M. L., Díaz, M. D. P., Chiabrando, G. A., Fassano, J. P., Costa, C., & Wunderlin, D. A. (2006). Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7235-7241.
- [10] OCDE/FAO, *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029*, OECD Publishing, París, 2020. <https://doi.org/10.1787/a0848ac0-es>. (Último acceso: 10/07/2023).
- [11] Pais, Ana. (30/11/2017). ¿Qué país es el verdadero rey del mate: Argentina, Paraguay o Uruguay? BBC New Mundo. <https://www.bbc.com/mundo>.
- [12] Mateos, R., Baeza, G., Sarriá, B., & Bravo, L. (2018). Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 241, 232-241.
- [13] Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of ethnopharmacology*, 136(3), 378-384.

- [14] Puligundla, P., Mok, C., Ko, S., Liang, J., & Recharla, N (2017). Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 34, 139-151.
- [15] Vanessa C, Williamson G (2004). A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in in-vivo Animal Models. *J. Nutr.* 134: 3431-3440.
- [16] Yamamoto MM, Inagaki N, Kitaura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, Kawakami T, Nagai H (2004). O-Methylated Catechins from Tea Leaves Inhibit Multiple Protein Kinases in Mast Cells. *J. Immunol.* 172: 4486-4492.
- [17] Paola RD, Mazzon E, Muia C, Genovese T, Menegazzi M, Zaffini R, Suzuki H, Cuzzocrea S (2005). Green Tea Polyphenols Attenuates Lung Injury in Carrageenan-Induced Pleurisy Injury in Mice. *Res.*, 6: 1465-9921
- [18] The Food and Agriculture Organization. <https://www.fao.org/> (Último acceso: 5/10/2023)
- [19] Hulanicki, A., Glab, S., & Ingman, F. O. L. K. E. (1991). Chemical sensors: definitions and classification. *Pure and applied chemistry*, 63(9), 1247-1250.
- [20] García, V. P. (2008). Sensores químicos basados en materiales moleculares: de la molécula al material, del material al dispositivo. *Anales de Química de la RSEQ*, (1), 5-14.
- [21] Conde, C. P (1996). Sensores ópticos (Vol. 30). Universitat de València
- [22] IUPAC Gold Book. Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- [23] Diezma, B., & Correa, E. C. (2018). Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama. *Agrociencia (Uruguay)*, 22(1), 13-25.
- [24] de Campos, D. A. R., Rocha Jr, J. G., Castro, R. N., & de Oliveira, I. R. (2023). Biosensores Eletroquímicos Baseados em Peroxidase: Revisão.
- [25] Naresh, V., Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109.
- [26] Wang, J. (2000) Analytical Electrochemistry. 2nd Edition, Wiley-VCH, New York.
- [27] Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I., Panjwani, M., Singh, S., Ahuja, Ch., Selvaraj, S., Banavoth, M., Sonar, P., Badoni, B. & Chakravorty, A. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 109, 21-51.
- [28] Reyes Melo, M. É., & Hinojosa Rivera, M. (2000). Estructura de sólidos amorfos. *Ingenierías*, 3(9), 7-14.
- [29] Fernández Navarro, J.M. (2003). El Vidrio. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Soc. Española de Cerámica y Vidrio, Madrid, España.

- [30] Barcelos, D. A., Leitao, D. C., Pereira, L. C., & Gonçalves, M. C. (2021). What is driving the growth of inorganic glass in smart materials and opto-electronic devices? *Materials*, 14(11), 2926.
- [31] Nogami, M., Maeda, T., & Uma, T. (2009). A methanol gas sensor based on inorganic glass thin films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 603-607.
- [32] Xu, W., Fu, K., Ma, C., & Bohn, P. W. (2016). Closed bipolar electrode-enabled dual-cell electrochromic detectors for chemical sensing. *Analyst*, 141(21), 6018-6024.
- [33] Ozmen, M., Can, K., Akin, I., Arslan, G., Tor, A., Cengeloglu, Y., & Ersoz, M. (2009). Surface modification of glass beads with glutaraldehyde: Characterization and their adsorption property for metal ions. *Journal of hazardous materials*, 171(1-3), 594-600.
- [34] Fabjan, E. Š., Nadrah, P., Ajdovec, A., Tomšič, M., Dražić, G., Mazaj, M. & Škapin, A. S. (2020). Colorimetric cutoff indication of relative humidity based on selectively functionalized mesoporous silica. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 316, 128138.
- [35] Xie, Z., Wang, F., & Liu, C. Y. (2012). Organic–inorganic hybrid functional carbon dot gel glasses. *Advanced materials*, 24(13), 1716-1721.
- [36] Hoppe, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757-2774.

CAPÍTULO

2

OBJETIVOS

2. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral se basa en el desarrollo de materiales vítreos para la fabricación de **sensores químicos y biosensores** que permitan detectar y/o cuantificar sustancias de interés en matrices agropecuarias. Estos sistemas, además, deben ser simples, rápidos, de bajo costo y amigables con el ambiente.

La concreción de este objetivo permitirá el desarrollo de un:

- **Sensor voltamperométrico** basado en una matriz vítrea de borato para la determinación de hierro en leche en polvo fortificada.
- **Sensor óptico** basado en una matriz vítrea de óxidos de molibdeno, sodio y boro para la determinación rápida de azúcares reductores en muestras de miel.
- **Biosensor visual** basado en un método innovador para anclar moléculas sensibles a glucosa sobre micropartículas vítreas de sílice.
- **Biosensor cronoamperométrico** empleando un electrodo de carbono vítreo modificado con matriz de hidrogel en presencia de polifenol oxidasa o tirosinasa (TIR) inmovilizada, para determinación de compuestos fenólicos totales (FOT) en té y yerba mate.

CAPÍTULO

3

SENSORES QUÍMICOS

CAPÍTULO

3.1

Sensor voltamperométrico basado en una matriz vítrea de borato para la determinación de hierro en leche en polvo fortificada

3.1.1. Objetivo

El objetivo de este capítulo es desarrollar una matriz vítrea de borato, modificada con óxidos de molibdeno, vanadio y litio. Este material se utilizará para diseñar un nuevo sensor electroquímico simple y se aumentará su conductividad con nanopartículas de carbono obtenidas por síntesis verde. Se evaluará la performance del sensor en la cuantificación de hierro en muestras de leche en polvo fortificada utilizando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada.

3.1.2. Introducción

Las vitaminas y los minerales son nutrientes esenciales necesarios para las funciones básicas de la vida. Entre los oligoelementos que participan en diferentes procesos biológicos se pueden mencionar el hierro, zinc, cobre, manganeso, etc [1]. La anemia por deficiencia de hierro (IDA) es un trastorno nutricional común en bebés, niños, adolescentes y mujeres. Varios estudios indican que el consumo de alimentos fortificados con hierro (como la leche y sus derivados) es efectivo para prevenir o reducir la deficiencia de hierro [2,3]. Por ello, los productos lácteos pueden contribuir a la ingesta de hierro [4]. El método oficial establecido por la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) para la determinación de minerales (incluido el hierro) en los alimentos es la espectrometría de absorción atómica de llama [5]. Por otro lado, algunos autores emplean espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito y espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente para determinar hierro en leche y alimentos para bebés debido a su amplio rango de detección y alta sensibilidad [6-9]. Sin embargo, estas técnicas requieren mucho tiempo, los instrumentos comerciales son caros y requieren un analista experimentado para su uso.

Las técnicas voltamperométricas se han utilizado ampliamente para determinar el contenido de metales tóxicos en el análisis de alimentos. Para estos estudios varios autores utilizan electrodos de mercurio, pero en la actualidad se ha limitado su aplicación debido a su toxicidad [10-12]. Por otro lado, el electrodo de gota de mercurio se ha utilizado también para determinar la concentración de hierro en muestras de vino utilizando polarografía de pulso diferencial [13]. Por tanto, el diseño de nuevos electrodos utilizando un material vítreo a base de óxidos inorgánicos, materiales compuestos y electrodos modificados son un reto para conseguir metodologías sensibles y respetuosas con el ambiente. Por ejemplo, los sistemas vítreos formados por óxido de telurio y óxidos de metales de transición, como V_2O_3 , MoO_5 , CuO , muestran propiedades eléctricas apropiadas y pueden aumentar la conductividad iónica, etc.

Pierini *et al.* desarrollaron electrodos compuestos basados en un sistema vítreo con un buen desempeño electroquímico, fáciles de preparar y que no requieren activación superficial [14,15].

Dimitriev *et al.* han demostrado que los vidrios de molibdato tienen propiedades específicas que les permiten ser utilizados en numerosas aplicaciones tecnológicas como sensores [16]. Además, los vidrios a base de borato de litio se pueden usar como electrodos ya que tienen apropiadas propiedades electroquímicas [17,18]. Por otro lado, Savidh Khan *et al.* establecieron que, en los sistemas de vidrio de vanadio, la conductividad mejora con la adición de Li_2O debido a la creación de mayor cantidad de sitios disponibles para el salto de iones [19].

En cuanto a la modificación de la superficie del electrodo, se han utilizado nanopartículas de carbono para este fin debido a su buena conductividad, alta estabilidad y movilidad de electrones, mayor funcionalización de la superficie, entre otros [20,21]. La síntesis de estas nanopartículas es generalmente muy simple y económica al poder seleccionar diferentes precursores de carbono [22]. Estas nanopartículas se pueden obtener en el laboratorio utilizando diferentes metodologías de síntesis [23].

3.1.3. Materiales y métodos

3.1.3.1. Reactivos y soluciones

Los reactivos empleados poseen pureza de grado analítico: óxido de boro (99,9 %, Sigma-Aldrich), óxido de molibdeno (99,9 %, Cerac), carbonato de litio (99,9%, Anedra Research AG. SA), óxido de vanadio (99,9 %, Cerac), potasio hexacianoferrato (II) trihidrato (Sigma-Aldrich), cloruro de potasio (Merck) y peróxido de hidrógeno (30 % m/m, Anedra). Para la síntesis de las nanopartículas de carbono se empleó una solución de miel comercial (25 % m/v), procedente de Hilario Ascasubi. Se preparó una solución buffer fosfato de pH 3,50 con fosfato diácido de potasio y ácido fosfórico (Merck). Se preparó una solución estándar de hierro (10,52 mM) mediante dilución de una cantidad apropiada de sulfato de amonio y hierro (II) hexahidratado (Cicarelli) con ácido nítrico 1:1 (Merck). Las soluciones de trabajo de hierro se prepararon a partir de la solución estándar con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno. Para preparar las soluciones, se utilizó agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Todo el trabajo se realizó a temperatura ambiente.

3.1.3.2. Muestras

Se utilizaron leches en polvo fortificadas comerciales adquiridas en la ciudad de Bahía Blanca.

Para la recolección de muestras de leche en polvo se utilizó el método del cuarteo o cono (Figura 3.1.1), el cual consiste en seleccionar un gran número de porciones de muestra de una manera sistemática de diferentes partes del total que luego se combinan. Primero se forma una pila cónica con la muestra de leche en polvo, luego la parte alta del cono se prensa y divide en cuartos. Los cuartos opuestos de la pila son removidos y mezclados para formar una pila cónica más pequeña y otra vez dividida en cuartos. Este proceso se repite hasta obtener una muestra de un peso adecuado de aprox. 200 g [24]. Las muestras de leche en polvo se subdividen en tres submuestras que fueron almacenadas en envases no permeables, a 60% de humedad relativa y una temperatura de 25°C según la norma FIL-IDF 50 B: 1985 "Métodos de muestreo para leche y productos lácteos" declarada en el CAA capítulo III RESOLUCIÓN GMC N° 025/02 [25].

Para determinar la concentración de hierro en las mencionadas muestras, se procedió a realizar el siguiente tratamiento: se pesó una cantidad adecuada de cada una y se calcinó en una mufla a 550°C hasta obtener cenizas blancas, tal como establece el método oficial AOAC 985,35 [26]. Las cenizas se recogieron con una solución de ácido nítrico 1 M y se filtraron (papel Whatman N°3). Finalmente se llevó a volumen final de 10,00 mL con agua y se almacenó a 4 °C hasta el análisis voltamperométrico.

Los rótulos nutricionales de las muestras de leches en polvo fortificadas se presentan en la Figura 3.1.2.

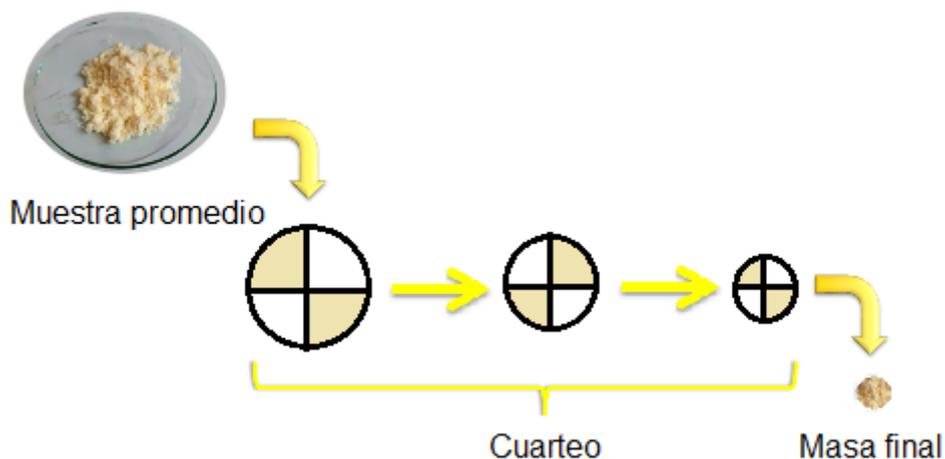


Figura 3.1.1. Procedimiento del método de cuarteo implementado.

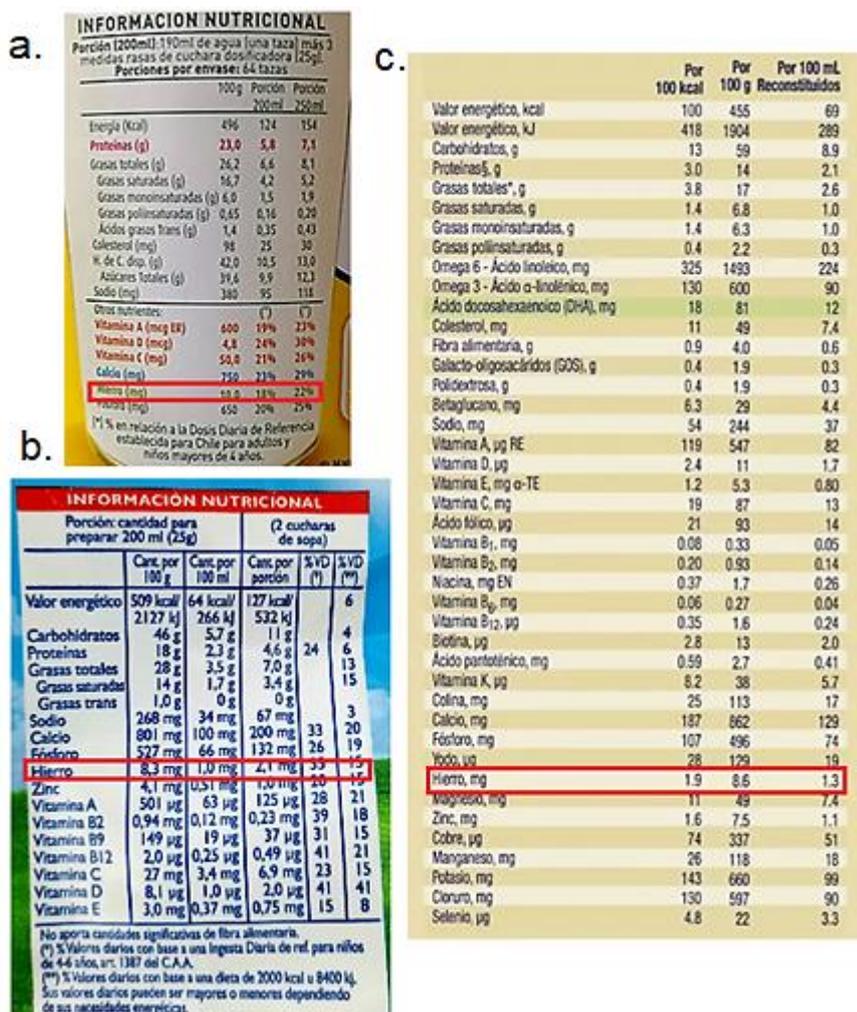


Figura 3.1.2. Fotografías de rótulos nutricionales de las muestras de leche en polvo estudiadas. a) M1, b) M2 y c) M3.

3.1.3.3. Instrumentación

La caracterización del vidrio sintetizado se realizó con un difractómetro de rayos X PHILLIPS PW1710 con un voltaje de 45 KV y un generador de corriente eléctrica de 40 mA. Las muestras se expusieron a radiación de Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) a temperatura ambiente en el rango de $2\theta: 10^\circ - 60^\circ$.

Los plasmones de resonancia superficial localizado (LSPR) de las nanopartículas de carbono sintetizadas, se midieron empleando un Espectrofotómetro UV-Vis Agilent Carry 60 de 200 a 500 nm usando una cubeta de cuarzo de trayectoria óptica de 1 cm.

Se empleó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar la morfología y el tamaño de estas nanopartículas, empleando un microscopio JEOL 100 CX II, operando a 100 kV. Para su medición, dos gotas de cada dispersión se colocaron en una malla de cobre y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las medidas voltamperométricas, se realizaron con un potenciostato de Epsilon (BASi-Bionalytical System, EE.UU.). Para esto, se utilizó una celda electroquímica de 25,0 mL con tres electrodos: el electrodo de trabajo desarrollado, un alambre de Pt como electrodo auxiliar y Ag|AgCl|KCl (3M) como electrodo de referencia. Los resultados se analizaron en un software de análisis electroquímico.

3.1.3.4. Preparación del electrodo de trabajo MLB/V/CNPs

El electrodo de trabajo MLB/V/CNPs se sintetizó en tres etapas. Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de un sistema vítreo borato modificado con óxidos de molibdeno y litio (MLBG). En función de estudios previos realizados en el grupo de Físicoquímica sobre conductividad polarónica en matrices vítreas [27], se agregó óxido de vanadio al material MLB/V, dando lugar al sistema MLB/V. El mismo se fundió para permitir la adhesión a un alambre de platino y formar el electrodo MLB/V. Finalmente, se obtuvo una suspensión de nanopartículas de carbono (CNPs) para modificar la superficie del electrodo MLB/V quedando así conformado el electrodo MLB/V/CNPs. A continuación, se detalla el procedimiento de cada una de estas etapas para la preparación de este sensor.

3.1.3.5. Preparación del material y electrodo MLB

Entre los métodos utilizados para la síntesis de materiales amorfos existe el melt quenching que, en general, se trata de fundidos obtenidos por reacción a alta temperatura que han de enfriarse controlada y rápidamente para evitar su cristalización. Empleando esta técnica de quenching se sintetizaron los materiales vítreos empleando óxidos de molibdeno, litio y boro [28]. Los óxidos se homogeneizaron en un mortero de ágata y se fundieron en mufla utilizando cápsulas de porcelana implementando una rampa de 500°C a 900°C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura se mantuvo a 900°C durante 2 horas y la mezcla se agitó frecuentemente para asegurar la homogeneidad. El fundido fue vertido sobre una placa de aluminio (previamente calentada a 200 °C) en forma de gotas y luego templadas durante 2 horas sobre la misma placa para reducir el estrés mecánico. El procedimiento desarrollado se puede observar en la Figura 3.1.3. Se desarrollaron los sistemas 0,05 MoO₃ 0,95 [α Li₂O (1- α) B₂O₃] con α = 0,15; 0,2; 0,25 y 0,3; llamados MLB1, MLB2, MLB3 y MLB4 respectivamente. Finalmente, para obtener los electrodos de trabajo, se calienta un alambre de platino, de manera que, al ponerlo en contacto con una porción del material, el mismo se adhiere en el extremo del alambre. El material MLB2 presentó una mejor

adherencia a la superficie del alambre de platino.

Los electrodos de trabajo fueron estudiados empleando voltamperometría cíclica obteniéndose la performance electroquímica óptima con MLB2.

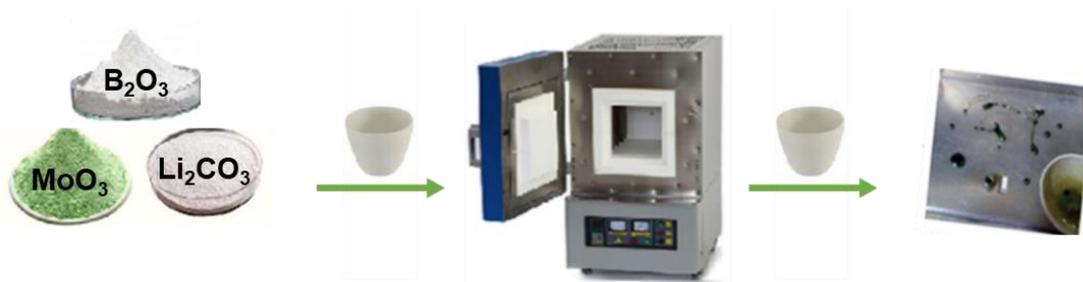


Figura 3.1.3. Representación esquemática del proceso de síntesis de los sistemas vítreos.

3.1.3.6. Preparación del material y electrodo MLB2/V

Con el fin de mejorar la respuesta electroquímica de MLB2 para ser utilizado como electrodo, a este sistema vítreo se le añadió óxido de vanadio (MLB2/V) que aumenta las propiedades electrónicas del material. La composición final fue 0,05 MoO₃ 0,05 V₂O₅ (0,18 Li₂O 0,72 B₂O₃). Finalmente, se adhirió este material a un alambre de platino para obtener el electrodo. Este sistema presentó mejor adherencia y maleabilidad al fusionarse en el alambre de platino que el material MLB2. Mediante el empleo de la técnica de voltamperometría cíclica se evaluó el comportamiento electroquímico de este electrodo.

3.1.3.7. Síntesis de nanopartículas de carbono para la modificación del electrodo MLB2/V

La preparación de nanopartículas de carbono (CNPs) se realizó utilizando una modificación del método de síntesis propuesta por Arroyave y col [29]. En este caso, se empleó miel ecológica como fuente de carbono previamente caracterizada en el grupo de investigación. Este producto apícola fue cosechado en un apiario en la región de Bahía Blanca y su contenido de glucosa fue de 35,1% (m/m). Para ello se preparó una solución de miel al 25% (m/v). A partir de esta solución se tomaron diferentes alícuotas ajustando el pH a 11,0 con una solución de NaOH 0,1 M y llevando a un volumen final de 10,0 mL con agua para obtener las soluciones finales de miel de 3,0, 6,0, 7,5 y 15,0 gL⁻¹. Estas soluciones, fueron tratadas en microondas durante 60 s a 350 W,

obteniéndose las nanopartículas CNPs1, CNPs2, CNPs3 y CNPs4 respectivamente.

Con el fin de mejorar la sensibilidad del electrodo MLBG2/V, se llevó a cabo la modificación de su superficie [30]. Para ello, con CNPs1, CNPs2, CNPs3 y CNPs4, se prepararon suspensiones en N, N-dimetilformamida (DMF) a partir de 0,5 mL de cada CNPs y 2,0 mL DMF. Las mismas fueron sometidas a la acción de ultrasonido durante 120 s a 50 W. Finalmente, el alambre de platino con MLBG2/V se sumergió en las suspensiones preparadas de CNPs/DMF, durante dos minutos, formando el electrodo final MLBG2/V/CNPs. Para conectar este electrodo al potenciostato, se diseñó un tubo de teflón (2,5 cm de largo y 0,5 cm de diámetro) con un orificio central que permite insertar cada electrodo [14] (Figura 3.1.4.)

El comportamiento electroquímico de estos electrodos se evaluó frente a la cupla ferrocianuro de potasio empleando KCl 0,1M como electrolito soporte, observándose una mayor corriente neta en el electrodo MLBG2/V/CNPs3.

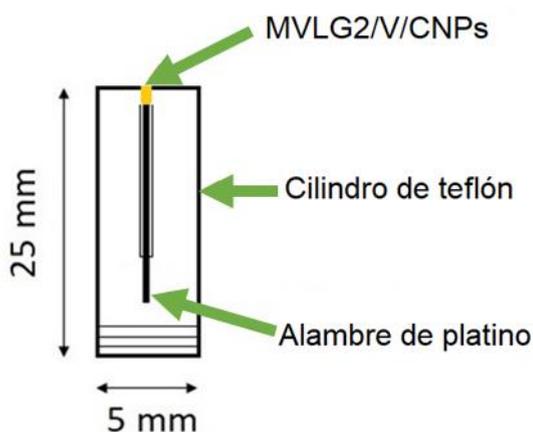


Figura 3.1.4. Esquema del electrodo MLBG2/V/CNPs diseñado en el laboratorio.

3.1.3.8. Mediciones voltamperométricas

Para las medidas voltamperométricas se utilizó una celda electroquímica de 25,0 mL con una configuración de tres electrodos. Como electrodos de trabajo se emplearon los diferentes electrodos desarrollados. Se empleó un electrodo de referencia de Ag|AgCl|KCl (3M) y un alambre en forma de espiral de platino como contraelectrodo. Los electrodos de trabajo no requieren pulido superficial.

La caracterización electroquímica se realiza mediante voltamperometría cíclica a diferentes velocidades de barrido utilizando una solución de ferrocianuro de potasio 2,5 mM en KCl 0,1 M como electrolito soporte. Antes de cada medición se estabiliza la superficie del electrodo de trabajo aplicando voltamperometría cíclica de -0,3 a 0,3 V

(velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}) en el electrolito de soporte.

Para la determinación de hierro se empleó voltamperometría de onda cuadrada (SWV) utilizando como electrolito soporte una solución buffer de fosfato de 0,1 M pH 7,0. Los parámetros óptimos de SWV fueron $\Delta E_{sw} = 10 \text{ mV}$, $f = 20 \text{ Hz}$ y $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Las medidas se realizaron a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

El área electroquímica de cada electrodo de trabajo diseñado, se obtuvo empleando la técnica de cronoamperometría [31]. Para ello, se utilizó una solución $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en KCl $0,1 \text{ M}$ (D_0 : $0,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Los cronoamperogramas registraron la respuesta de la intensidad de corriente (I) en el tiempo (t), luego de aplicar un salto de potencial desde 0 a 800 mV. Estos parámetros se relacionan según la Ecuación de Cottrell (1):

$$I(t) = \frac{nFAC_0^*D_0^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1)$$

Donde I es la corriente límite de difusión (A), n el número de electrones transferidos, A el área de trabajo (cm^2), C_0^* la concentración de la especie electroactiva (mol cm^{-3}), D_0 el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) y F la constante de Faraday ($96500 \text{ A s mol}^{-1}$)

El valor de la superficie activa que posee el electrodo de trabajo se puede estimar teniendo en cuenta que la relación lineal de I en función del $t^{-1/2}$ posee un valor del pendiente dado por la ecuación (2):

$$Pend = \frac{nFAC_0^*D_0^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (2)$$

Para cada electrodo de trabajo se calculó una superficie activa promedio con los datos experimentales obtenidos de cinco cronoamperogramas registrados.

3.1.4. Resultados y discusión

3.1.4.1. Caracterización de los materiales sintetizados

Se realizaron las correspondientes caracterizaciones de los diferentes materiales sintetizados con la finalidad de evaluarlos como electrodos de trabajo.

3.1.4.1.1. Caracterización de electrodos MLBG

Se realizó un estudio electroquímico mediante voltamperometría cíclica y se analizó la respuesta de los electrodos de trabajo MLBG1, MLBG2, MLBG3 y MLBG4 en la solución de ferrocianuro de potasio 2,5 mM empleando KCl 0,1 M como electrolito soporte. Este estudio se realizó a diferentes velocidades de barrido de 10 a 150 mV s⁻¹. Para poder comparar las corrientes obtenidas para cada electrodo, se trabajó con la densidad de corriente “J” (corriente/área de trabajo). Todos los voltagramas se realizaron entre 0 y 1 V (vs Ag|AgCl|KCl (3 M)). La Figura 3.1.4 muestra los voltamperogramas registrados para cada sistema MLBG en función de la velocidad de barrido. Los parámetros obtenidos como el potencial del pico anódico (E_{pa}), el potencial del pico catódico (E_{pc}), la densidad de corriente del pico anódico (J_{pa}), la densidad de corriente del pico catódico (J_{pc}), y la diferencia de potencial entre los picos anódico y catódico (ΔE) de los voltamperogramas correspondientes a los sistemas MLBG1, MLBG2, MLBG3 y MLBG4 en función de la velocidad de barrido, se muestran en la Tabla 3.1.1. Analizando los resultados, se puede observar que, a la misma velocidad de barrido, una menor concentración de litio produce una disminución en ΔE, lo que demuestra que empleando MLBG1, la reacción electroquímica de transferencia de electrones es más reversible y rápida. La separación de pico a pico está directamente relacionada con la cinética de transferencia de electrones. Además, un aumento en la velocidad de barrido genera un ligero aumento en la diferencia de potencial entre el pico anódico y catódico (ΔE) en MLBG2 a MLBG4. Luego, la reacción electroquímica de transferencia de electrones más reversible y rápida ocurre a un ΔE más bajo (MLBG2). Para los sistemas MLBG2 a MLBG4, se determinó que la corriente máxima anódica es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo que indica que la reacción está controlada mediante procesos de difusión. Por ejemplo, para el sistema MLBG2, la ecuación de la recta que se obtiene de graficar I_{pa} frente a V^{0,5} da como resultado la siguiente ecuación: I_{pa} = 1,3 v^{0,5} + 9,58 (R² = 0,96). Además, para MLBG2 y MLBG3, la relación de corriente máxima de pico anódico a catódico (I_{pa}/I_{pc}) se acerca a uno para todas las velocidades de barrido. Por lo tanto, se seleccionó el sistema MLBG2.

Tabla 3.1.1. Valores de E_{pa} , E_{pc} , ΔE , J_{pa} , J_{pc} a 10, 25, 50, 75, 100 y 150 mVs^{-1} , empleando un par redox de ferro/ferricianuro de potasio con electrodos MLBG1, MLBG2, MLBG3 y MLBG4.

Velocidad de barrido (mVs^{-1})	MLBG1					MLBG2					MLBG3					MLBG4				
	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE (V)	J_{pa} ($\mu A cm^{-2}$)	J_{pc} ($\mu A cm^{-2}$)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE (V)	J_{pa} ($\mu A cm^{-2}$)	J_{pc} ($\mu A cm^{-2}$)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE (V)	J_{pa} ($\mu A cm^{-2}$)	J_{pc} ($\mu A cm^{-2}$)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE (V)	J_{pa} ($\mu A cm^{-2}$)	J_{pc} ($\mu A cm^{-2}$)
10	0,726	0,645	0,081	38,0	-33,0	0,712	0,612	0,100	249	-256	0,802	0,630	0,172	289	-286	0,790	0,598	0,192	239	-177
25	0,725	0,647	0,078	41,0	-36,0	0,738	0,607	0,131	338	-310	0,818	0,625	0,193	391	-399	0,817	0,584	0,233	254	-352
50	0,724	0,652	0,072	53,0	-42,0	0,757	0,601	0,156	372	-378	0,810	0,617	0,193	476	-476	0,825	0,578	0,247	322	-439
75	0,724	0,652	0,072	53,0	-46,0	0,757	0,598	0,159	422	-415	0,821	0,617	0,204	496	-486	0,839	0,576	0,263	339	-498
100	0,727	0,648	0,079	59,0	-49,0	0,759	0,598	0,161	462	-493	0,833	0,613	0,220	524	-491	0,856	0,559	0,297	583	-601
150	0,728	0,649	0,079	73,0	-59,0	0,760	0,595	0,165	485	-509	0,835	0,610	0,225	579	-490	0,862	0,541	0,321	640	-713

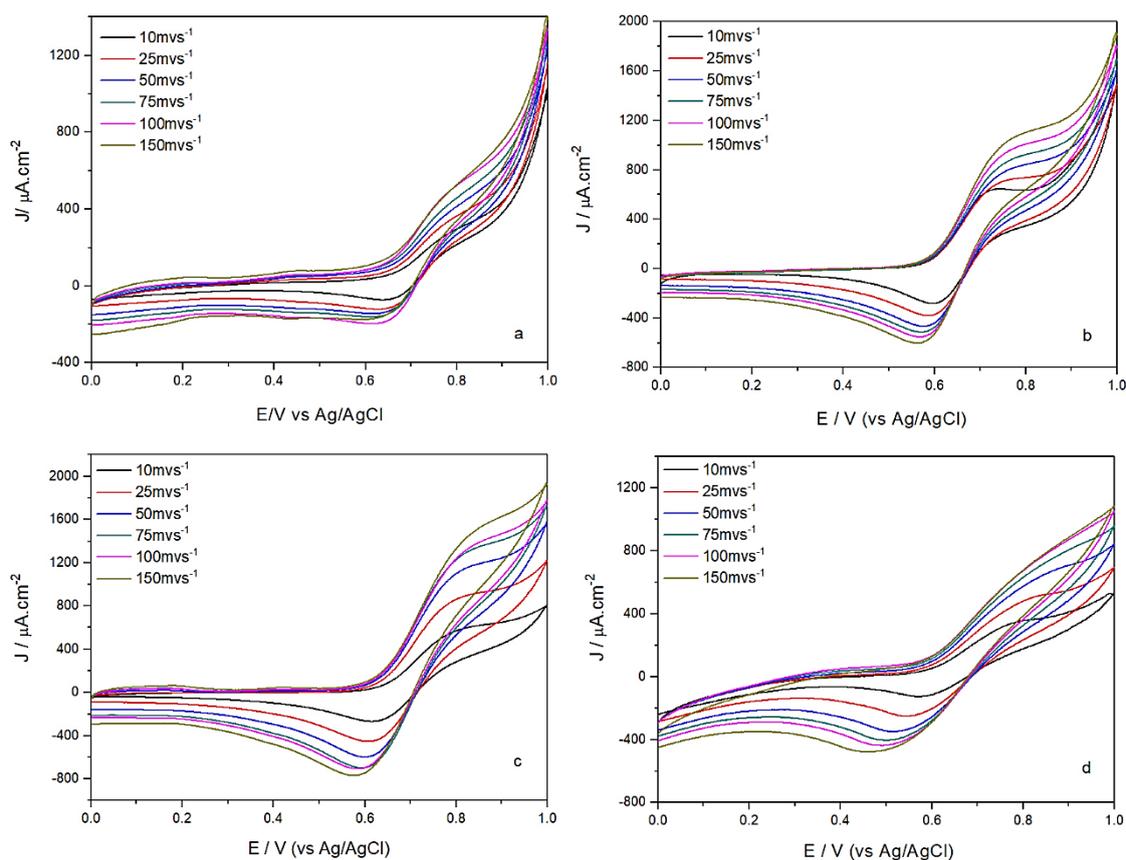


Figura 3.1.5. Voltagramas cíclicos de a) MLBG1, b) MLBG2, c) MLBG3 y d) MLBG4 a diferentes velocidades de barrido del par redox de ferro/ferricianuro de potasio.

3.1.4.1.2. Caracterización del electrodo MLBG2/V

El material MLBG2/V tiene una composición similar a otros reportados en la literatura cuya respuesta eléctrica ha sido estudiada [28, 32]. El difractograma de rayos X del material MLBG2/V no muestra la presencia de picos agudos e intensos, lo que demuestra la naturaleza amorfa del material (Figura 3.1.6).

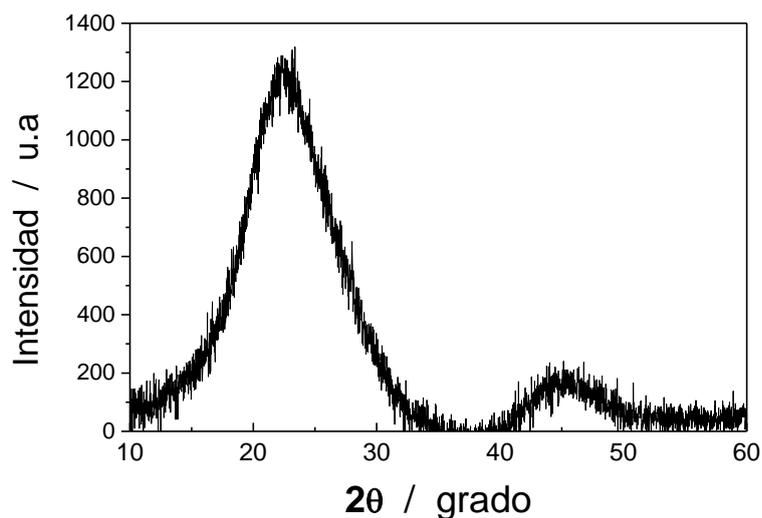


Figura 3.1.6. Patrones de difracción de rayos X para material MLBG2/V.

Por otro lado, se estudió la respuesta electroquímica de MLBG2/V frente a una solución de ferrocianuro de potasio en KCl como electrolito de soporte, utilizando voltamperometría cíclica. La respuesta de este nuevo electrodo de trabajo se analizó en función de la velocidad de barrido (25, 50, 100, 150 mVs^{-1}) (Figura 3.1.7). Para el sistema MLBG2/V, I_{pa} frente a $V^{0,5}$ da como resultado una relación lineal ($I_{pa} = 2,09 V^{0,5} + 9,36$ ($R^2=0,989$)), indicando un proceso controlado por difusión.

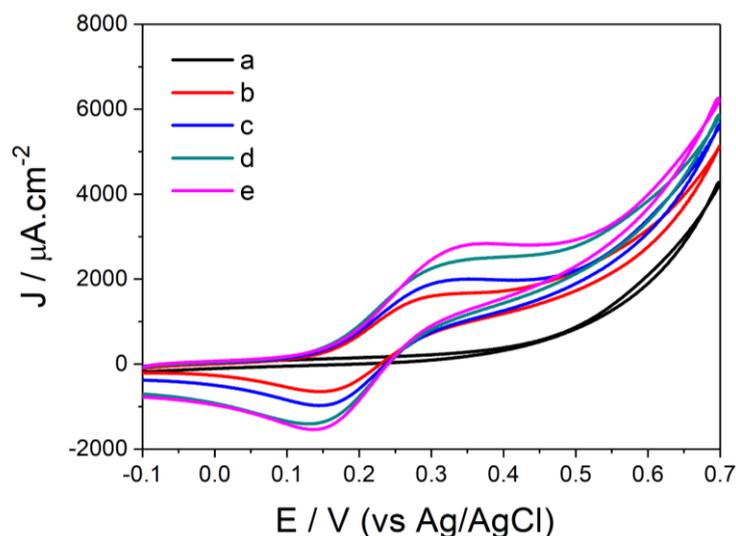


Figura 3.1.7. (a) Voltograma cíclico de 0,1 M KCl con electrodo MLBG2/V/CNPs3 a 50 mVs^{-1} (blanco). Voltagramas cíclicos de MLBG2/V en hexacianoferrato de potasio (II) 0,1 M KCl a diferentes velocidades de barrido (b) 25 mVs^{-1} , (c) 50 mVs^{-1} , (d) 100 mVs^{-1} y (e) 150 mVs^{-1}

3.1.4.1.3. Caracterización del electrodo MLBG2/V/CNPs3

Las CNPs se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis. Se realizó una dilución adecuada en agua para obtener los plasmones de resonancia superficial localizados (LSPR) correspondientes a las nanopartículas obtenidas. La Figura 3.1.8 muestra los LSPR de CNPs1, CNPs2, CNPs3 y CNPs4 y se puede observar la banda característica correspondiente con un máximo a 270 nm que podría atribuirse a la transición $n-\pi^*$ del grupo $\text{C}=\text{O}$ [33], esta banda aumenta a medida que aumenta la concentración de miel utilizada. Además, se complementa con un estudio TEM donde la dispersión de tamaño de las partículas es relativamente pequeña, siendo el tamaño promedio de las nanopartículas entre 3 y 4 nm (Figura 3.1.9).

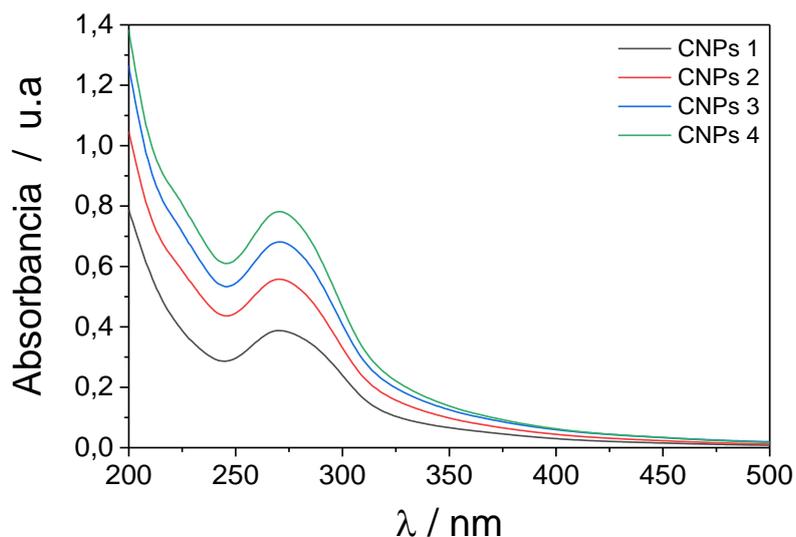


Figura 3.1.8. Bandas de resonancia de plasmones superficiales de las CNPs.

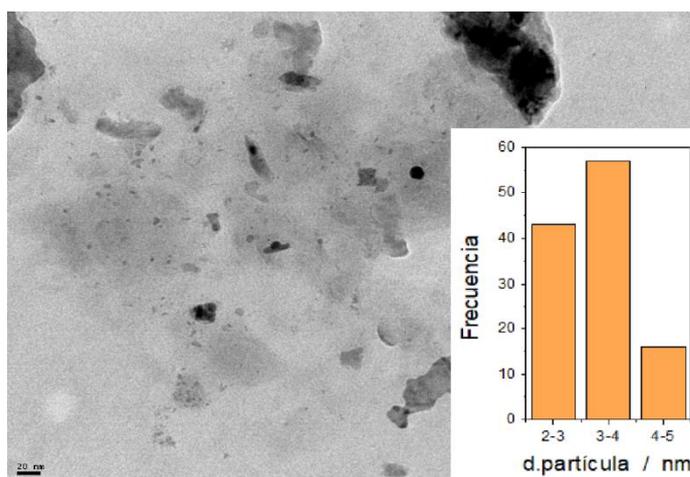


Figura 3.1.9. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de carbono sintetizadas.

Con cada electrodo MLBG2/V/CNPs, se realizó un estudio de la densidad de corriente de los picos de oxidación del ferrocianuro de potasio. Como se muestra en la Figura 3.1.10, la mayor densidad de corriente se obtuvo con el electrodo MLBG2/V/CNPs3. Además, cuando se modificó MLBG2/V con CNPs3, el voltamperograma está más definido y los picos de potencial anódico y catódico están ligeramente más cerca. Este electrodo fue seleccionado. La Figura 3.1.11 muestra voltagramas cíclicos de la solución de ferrocianuro de potasio en KCl, registrados para MLBG2/V y MLBG2/V/CNPs3 a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} . El estudio se realizó por triplicado.

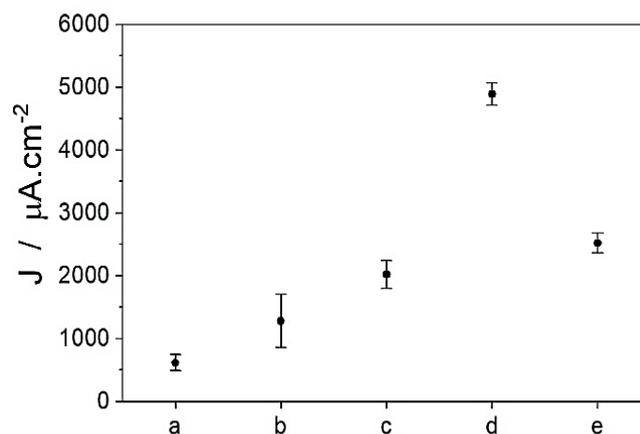


Figura 3.1.10. Densidad de corriente del ferrocianuro de potasio empleando los electrodos a) MLBG2, b) MLBG2/CNPs1, c) MLBG2/CNPs2, d) MLBG2/CNPs3 y e) MLBG2/CNPs4.

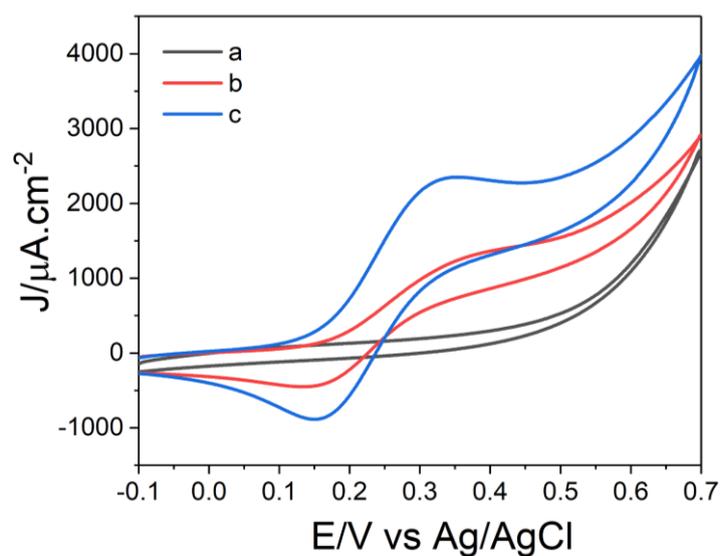


Figura 3.1.11. (a) Voltograma cíclico de 0,1 M KCl con electrodo MLBG2/V/CNPs3 a 50 mVs^{-1} (blanco). Voltagramas cíclicos de hexacianoferrato de potasio (II), 0,1 M KCl a 50 mVs^{-1} (b) MLBG2/V y (c) MLBG2/V/CNPs3.

3.1.4.2. Aplicaciones analíticas

Se evaluó la aplicabilidad del electrodo de trabajo MLBG2/V/CNPs3 mediante voltamperometría de onda cuadrada para la determinación de hierro en muestras comerciales de leche en polvo.

3.1.4.2.1. Optimización de parámetros de voltamperometría de onda cuadrada (SWV)

Los parámetros de SWV se optimizaron con un diseño experimental de Box-Behnken que estudia la variación de la respuesta analítica en base a los distintos factores de la técnica. Así, permite encontrar un modelo tal que explique la naturaleza de las reacciones, seleccionar cuales son las variables significativas y a qué nivel, y hallar las condiciones experimentales óptimas. La función o modelo que ajuste el diseño experimental no necesariamente es lineal, puede ser cuadrática o polinómica [34].

Para ello, se utilizó un software Minitab 19 para la optimización de los parámetros electroquímicos con la finalidad de determinar la mejor respuesta voltamperométrica empleando una solución de trabajo de hierro de $2,62 \text{ mgL}^{-1}$ y una solución buffer fosfato pH 3,50 como electrolito soporte. La corriente de pico máxima neta correspondiente a la reducción del hierro se utiliza como respuesta analítica. Todos los experimentos se realizaron aleatoriamente para evitar errores sistemáticos. Se analizaron tres factores: salto de potencial (ΔE_s : 2, 5 y 8 mV), frecuencia (f: 20, 50 y 70 Hz) y amplitud de onda cuadrada (ΔE_{sw} : 10, 30 y 50 mV). El diseño estudia la variación de la respuesta en base a los distintos factores de la técnica. El diseño experimental de quince experimentos (Tabla 3.1.2) se llevó a cabo con un análisis ANOVA (análisis de varianza) para evaluar los valores experimentales.

Las superficies de respuesta fueron representadas por la ecuación (3) donde las unidades para los factores de ΔE_s y ΔE_{sw} fue mV y para f en Hz:

$$I_{p,n} = 3,626 - 0,0193 f - 0,329 \Delta E_s - 1,1274 \Delta E_{sw} - 0,000194 f * f - 0,0229 \Delta E_s * \Delta E_s + 0,006367 \Delta E_{sw} * \Delta E_{sw} + 0,00786 f * \Delta E_s + 0,000919 f * \Delta E_{sw} + 0,00154 \Delta E_s * \Delta E_{sw} \quad (3)$$

Las superficies de respuesta obtenidas por el modelo se presentan en la Figura 3.1.12. A partir de su análisis, se puede evaluar que los tres factores de onda cuadrada estudiados (ΔE_{sw} , ΔE_s y f), resultaron ser estadísticamente significativos con un $\alpha=0,05$, para el pico de reducción.

El gráfico de Pareto obtenido tras el análisis de los datos experimentales se presenta en la Figura 3.1.13, e indica los factores e interacciones que son estadísticamente significativos. Se puede observar que tanto los factores ΔE_s , f, ΔE_{sw} , como sus interacciones resultan significativos para un valor del nivel de significación de 0,05.

Analizando tanto la ecuación (3) como las superficies de respuesta y el diagrama de Pareto, los incrementos en los valores de frecuencia, salto de potencial y amplitud de la onda cuadrada proporcionan una disminución de la corriente de pico neta. Además, en concordancia con el análisis de residuos, el coeficiente de determinación obtenido de $R^2 = 0,99$ indica un muy buen ajuste del modelo. Las condiciones óptimas de trabajo seleccionadas fueron: $\Delta E_{sw} = 50$ mV, $f = 20$ Hz y $\Delta E_s = 2$ mV. Como se puede observar, los valores seleccionados para ΔE_s , f , ΔE_{sw} , corresponden a los extremos de las superficies con la mayor señal de corriente de pico neto de reducción. En estudios preliminares se observó que valores menores de f y de ΔE_s , no generaban cambios significativos en la respuesta analítica y valores de ΔE_{sw} superiores a 50 mV generan ensanchamiento del pico de reducción.

Tabla 3.1.2. Parámetros experimentales para cada experimento empleados en el diseño de optimización Box-Benkhen.

Experimento N°	f (Hz)	ΔE_s (mV)	ΔE_{sw} (mV)
1	80	2	30
2	50	8	50
3	50	8	10
4	20	5	50
5	80	8	30
6	50	2	10
7	50	2	50
8	80	5	10
9	50	5	30
10	80	5	50
11	20	2	30
12	20	8	30
13	50	5	30
14	20	5	10
15	80	5	10

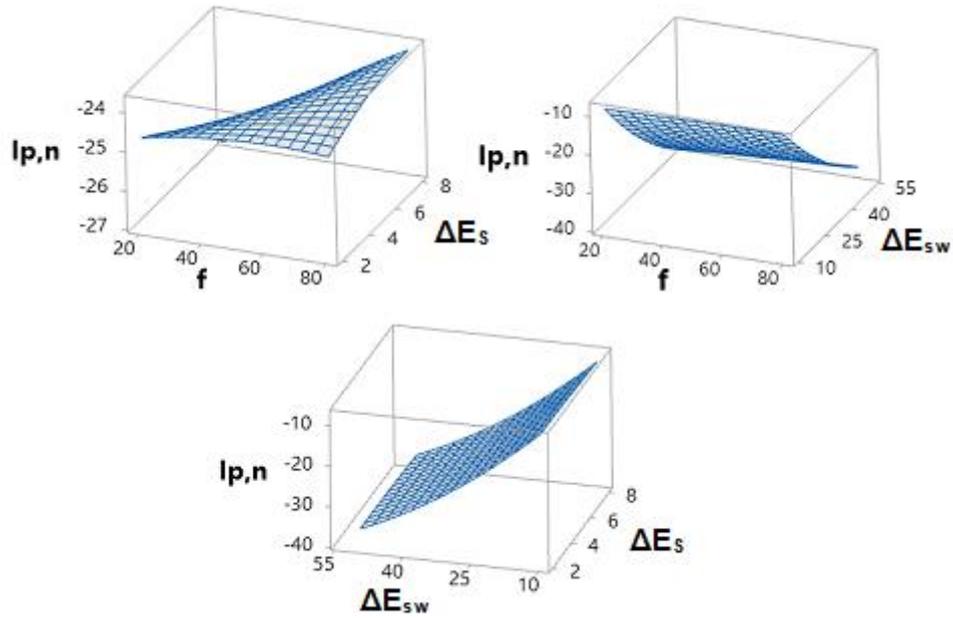


Figura 3.1.12. Superficies de respuesta para el diseño Box-Benken.

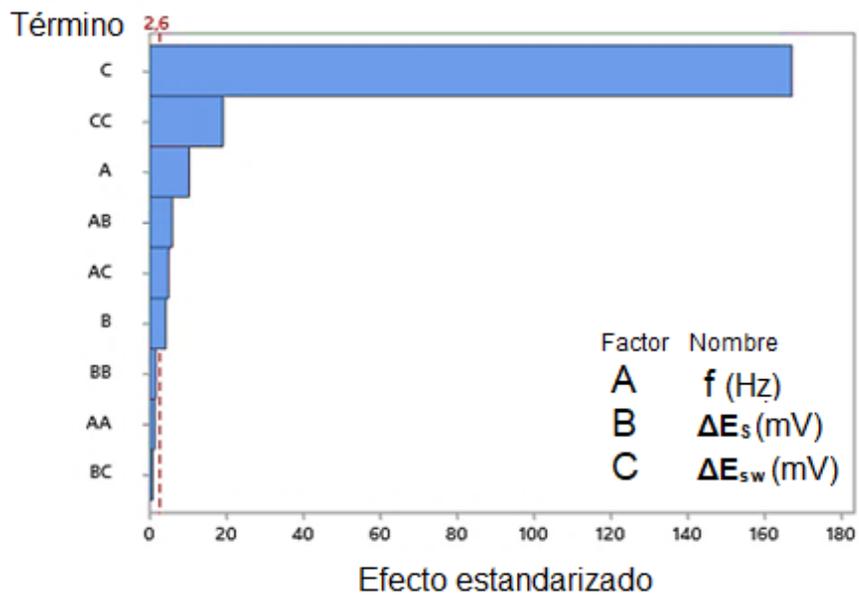


Figura 3.1.13. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados. El nivel de significación $\alpha = 0,05$ se indica con la línea vertical.

3.1.4.2.2. Parámetros analíticos

Se estudió un rango de concentración lineal de 0,3 a 5,9 mgL^{-1} de hierro con las condiciones experimentales seleccionadas (Figura 3.1.14). La curva de calibrado fue $J = (1,09 \pm 0,39) + (9,46 \pm 0,10) C_{\text{Fe}}$ donde J representa la densidad de corriente de pico

neta y C_{Fe} la concentración de hierro (mgL^{-1}). El coeficiente de correlación lineal R^2 fue de 0,999. La repetibilidad se calculó como el porcentaje de variación con respecto a la desviación estándar de seis mediciones independientes de una solución de hierro de $0,80 \text{ mgL}^{-1}$ y el valor obtenido fue de 6,18 %. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron $0,18$ y $0,60 \text{ mgL}^{-1}$ estimados como 3 y 10 veces $S_{y/x}$ /pendiente respectivamente [35]. El valor LOD fue mucho más bajo que la concentración de hierro en las muestras de leche en polvo, lo que demostró que el electrodo MLBG2/V/CNPs3 podía usarse para el análisis.

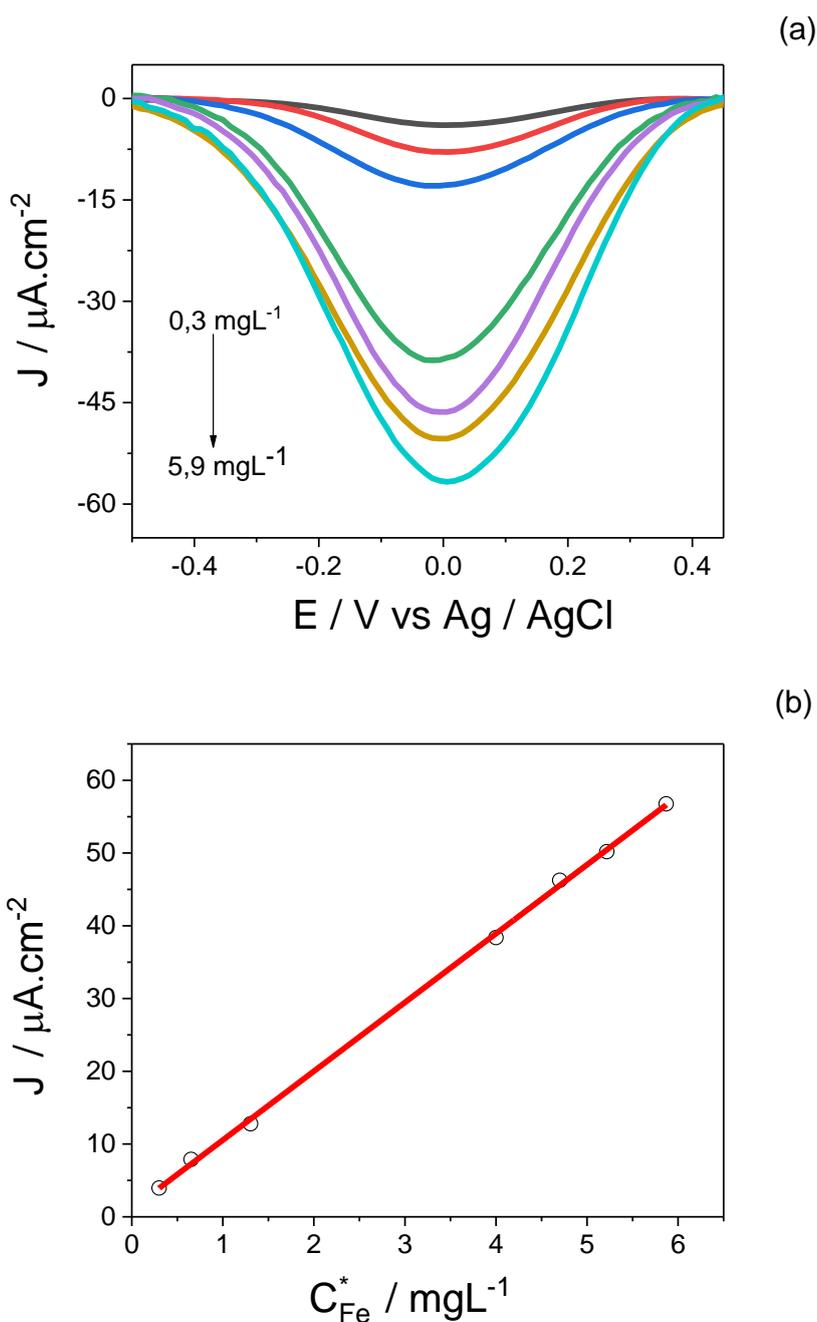


Figura 3.1.14. a) Voltograma SWV de soluciones de hierro en el rango entre $0,3$ y $5,9 \text{ mgL}^{-1}$ y b) curva de calibración obtenida en las condiciones óptimas.

Algunos autores han propuesto la cuantificación del hierro empleando técnicas voltamperométricas, sin embargo, dentro de nuestro conocimiento, no se ha informado la determinación de este analito mediante técnicas electroquímicas. Babaei y col usaron un electrodo de gota de mercurio para determinar el hierro en agua de red y soluciones patrones, a diferencia del electrodo propuesto en este trabajo que se sintetiza con materiales sustentables [36]. Por otro lado, se empleó voltamperometría de pulso diferencial catalítica para determinar hierro en muestras de alimentos como verduras, frutas y cereales con un tiempo de deposición prolongado (600 s), a diferencia del método propuesto que no requiere un paso de preconcentración, lo que favorece la frecuencia de muestreo [37]. Asimismo, se utilizó voltamperometría de redisolución adsorbtiva para determinar hierro en agua de mar. Para ello se empleó un complejo de hierro con 1-(2-piridylazo)-2-naftol (PAN) sobre un electrodo de carbón vítreo con film de bismuto. Esta metodología requiere un paso de purga con nitrógeno durante al menos 5 min antes de la determinación y 60 s de tiempo de acumulación [38].

3.1.4.2.3. Aplicación a muestras de leche en polvo fortificada

El método electroanalítico propuesto se aplicó a la determinación de hierro en tres muestras de leche en polvo fortificada (M1, M2 y M3), bajo las condiciones experimentales óptimas. Para esta propuesta, se analizó una alícuota adecuada de cada muestra empleando como electrolito soporte una solución buffer fosfato pH 3,50. Las medidas se registraron a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con los valores de ICP-OES (Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo) y revelaron una buena concordancia entre ambos métodos. Además, se pudo confirmar que el contenido de hierro estaba de acuerdo con la información nutricional declarada en la etiqueta (Tabla 3.1.4).

Tabla 3.1.4. Comparativo del contenido de hierro determinado en leche en polvo fortificada con el método propuesto y comparación con ICP-OES (desviación estándar media, n=3)

Muestras	Fe [mg/100g _{leche}]			
	Rótulo nutricional	Método propuesto	ICP-OES	Error relativo [%]
M1	10	9,8 ± 0,2	9,5 ± 0,9	+3,1
M2	8,3	8,0 ± 0,5	8,4 ± 0,6	-5,0
M3	8,6	8,4 ± 0,3	8,5 ± 0,6	-1,2

3.1.5. Conclusiones parciales

En resumen, se desarrolló un electrodo de matriz vítrea de borato con óxidos de molibdeno, vanadio y litio modificada en su superficie con CNPs (MLBG2/V/CNPs3) para ser utilizado como un sensor alternativo en técnicas electroanalíticas y mostró un excelente rendimiento utilizando voltamperometría de onda cuadrada (SWV). El desarrollo de esta matriz de vidrio modificada superficialmente con las CNPs, permitió aumentar la superficie de contacto del electrodo de trabajo y, por lo tanto, incrementar las propiedades conductoras del material. Es importante destacar que tanto el material de vidrio como los CNPs se sintetizaron en nuestro laboratorio. El método de síntesis utilizado para la obtención de CNPs es simple, rápido, no requiere el empleo de reactivos costosos ni genera residuos tóxicos.

Los parámetros SWV óptimos obtenidos por un diseño de Box-Behnken fueron $\Delta E_{sw} = 50$ mV, $f = 20$ Hz y $\Delta E_s = 2$ mV. El sensor voltamperométrico de hierro mostró un rango lineal entre $0,3$ a $5,9$ mgL^{-1} y el LOD fue de $0,18$ mgL^{-1} . Por otro lado, este sensor modificado tuvo buena repetibilidad (6,18 %). Se analizaron tres muestras de leche en polvo fortificada y los resultados obtenidos se validaron mediante la técnica ICP-AES mostrando buena concordancia entre ellas. Los resultados obtenidos concuerdan con los indicados en la información nutricional de rótulo alimentario del envase de las muestras de leche. Este sensor permite controlar fácilmente los niveles de hierro en muestras de leche mediante la técnica de voltamperometría de onda cuadrada y puede ser una buena opción en los análisis de rutina.

3.1.6. Bibliografía

- [1] Delvin, E., & Levy, E. (2020). Trace elements: functions and assessment of status through laboratory testing. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 851-864). Academic Press.
- [2] Santillán-Urquiza, E., Ruiz-Espinosa, H., Angulo-Molina, A., Ruiz, J. F. V., & Méndez-Rojas, M. A. (2017). Applications of nanomaterials in functional fortified dairy products: benefits and implications for human health. In *Nutrient Delivery* (pp. 293-328). Academic Press.
- [3] Silva, M. R., Dias, G., Ferreira, C. L., Franceschini, S. C., & Costa, N. M. (2008). Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplemented with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutrition Research*, 28(4), 226-232.
- [4] Diyabalanage, S., Kalpage, M. D., Mohotti, D. G., Dissanayake, C. K. K., Fernando, R., Frew, R. D., & Chandrajith, R. (2021). Comprehensive assessment of essential and potentially toxic trace elements in bovine milk and their feeds in different agro-climatic zones of Sri Lanka. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1377-1388.
- [5] Poitevin, E. (2016). Official methods for the determination of minerals and trace elements in infant formula and milk products: A Review. *Journal of AOAC International*, 99(1), 42-52.
- [6] Saracoglu, S., Saygi, K. O., Uluozlu, O. D., Tuzen, M., & Soylak, M. (2007). Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. *Food Chemistry*, 105(1), 280-285.
- [7] Santos, A. S., de Souza, C. T., Leao, D. J., Correia, F. O., Almeida, T. S., & Ferreira, S. L. (2020). Simultaneous determination of chromium and iron in powdered milk using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Analytical Methods*, 13, 284-290.
- [8] Astolfi, M. L., Marconi, E., Protano, C., Vitali, M., Schiavi, E., Mastromarino, P., & Canepari, S. (2018). Optimization and validation of a fast digestion method for the determination of major and trace elements in breast milk by ICP-MS. *Analytica chimica acta*, 1040, 49-62.
- [9] de Oliveira Trinta, V., de Carvalho Padilha, P., Petronilho, S., Santelli, R. E., Braz, B. F., Freire, A. S., Saunders, C., Fernandes da Rocha, E., Sanz-Medel, A., & Fernández-Sánchez, M. L. (2020). Total metal content and chemical speciation analysis of iron, copper, zinc and iodine in human breast milk using high-performance liquid chromatography separation and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Food chemistry*, 326, 126978.

- [10] Shahbazi, Y., Ahmadi, F., & Fakhari, F. (2016). Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. *Food chemistry*, 192, 1060-1067.
- [11] Suturović, Z., Kravić, S., Milanović, S., Đurović, A., & Brezo, T. (2014). Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step. *Food chemistry*, 155, 120-125.
- [12] Khan, I., Pandit, U. J., Wankar, S., & Limaye, S. N. (2017). Centrifugation assisted digestion for simultaneous voltammetric determination of ultra trace metal ions in water and milk samples. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 64-72.
- [13] Somer, G., & Çalışkan, A. C. (2009). A new method for the simultaneous determination of Fe (III), Cu (II), Pb (II), Zn (II), Cd (II), and Ni (II) in wine using differential pulse polarography. *Journal of applied electrochemistry*, 39, 2027-2033.
- [14] Pierini, G. D., Presa, J. M., Frechero, M. A., Centurión, M. E., & Di Nezio, M. S. (2014). An innovative micrometric granular graphite–glass system composite electrode “ready to use” in voltammetry techniques. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 433-439.
- [15] Pierini, G. D., di Pratula, P. E., Ochoa, A. L., Centurión, M. E., Frechero, M. A., & Di Nezio, M. S. (2020). Synthesis of a Conductive Glassy System Based on Inorganic Oxides and Carbon Materials and Their Possible Electroanalytical Application. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30, 2764-2773.
- [16] Dimitriev, Y., & Iordanova, R. (2009). Non-traditional molybdate glasses. *Physics and Chemistry of Glasses-European Journal of Glass Science and Technology Part B*, 50(2), 123-132.
- [17] Cardillo, E. C., Molina, V. M., Sola, M. E., Terny, C. S., Di Pratula, P. E., & Frechero, M. A. (2018). Effect of small mobile cations on molybdenum borate glasses. *Material Sci & Eng.*, 2, 199-204.
- [18] Butnoi, P., Chanlek, N., Poo-arporn, Y., Pinitsoontorn, S., Maensiri, S., & Kidkhunthod, P. (2019). Structure-function of novel glasses for possibility as cathode of Li-ion battery: lithium manganese borate glasses. *Journal of Alloys and Compounds*, 809, 151811.
- [19] Khan, S., & Singh, K. (2020). Structural, optical, thermal and conducting properties of $V_2-xLi_xO_5-\delta$ ($0.15 \leq x \leq 0.30$) systems. *Scientific Reports*, 10(1), 1089.
- [20] Asadian, E., Ghalkhani, M., & Shahrokhian, S. (2019). Electrochemical sensing based on carbon nanoparticles: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 293, 183-209.
- [21] Maduraiveeran, G., & Jin, W. (2021). Carbon nanomaterials: Synthesis, properties

and applications in electrochemical sensors and energy conversion systems. *Materials Science and Engineering: B*, 272, 115341.

[22] Balasooriya, E. R., Jayasinghe, C. D., Jayawardena, U. A., Ruwanthika, R. W. D., Mendis de Silva, R., & Udagama, P. V. (2017). Honey mediated green synthesis of nanoparticles: new era of safe nanotechnology. *Journal of Nanomaterials*, 2017.

[23] Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 844-851.

[24] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO), Guía para muestreo de alimentos, disponible en: http://www.sanipes.gob.pe/normativas/9_GuiaparaMuestreoparaAlimento.pdf

[25] CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, CAA. (2017). III Resolución GMC N° 025/02, "Métodos de muestreo para leche y productos lácteos", disponible en https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_iii_prod_alimenticiosactualiz_2_017-10.pdf (Último acceso: octubre 2023).

[26] AOAC, B. A. M. (1990). Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis*, 12.

[27] Hernandez Garcia, L. A., Molina, M. C., Zoratti, M., Cardillo, E. C., Terny, C. S., Sola, M. E., & Frechero, M. A. (2019). Ion-polaron interaction in modified tellurite glasses. *Material Science & Engineering International Journal*; Lugar: Budapest, 3 (4), 113-116.

[28] Di Pratula, P. E., Terny, S., Sola, M. E., & Frechero, M. A. (2017). Ionic conductivity enhancement achieved by the incorporation of ZnO in a lithium tellurite glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 461, 18-23.

[29] Arroyave Rodriguez, J. M., Springer, V. H., & Centurión, M. E. (2019). Novel Synthesis Without Separation and Purification Processes of Carbon Dots and Silver/Carbon Hybrid Nanoparticles. *J Inorg Organomet Polym Mater*, 30.

[30] Metto, M., Eramias, S., Gelagay, B., & Washe, A. P. (2019). Voltammetric determination of uric acid in clinical serum samples using DMF modified screen printed carbon electrodes. *International Journal of Electrochemistry*, 2019, 1-8.

[31] Bard, A. J., Faulkner, L. R., & White, H. S. (2022). *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.

[32] Montani, R. A., & Frechero, M. A. (2006). Mixed ion-polaron transport in lithium vanadium–molybdenum tellurite glasses. *Solid State Ionics*, 177(33-34), 2911-2915.

[33] Arroyave, J. M., Ambrusi, R. E., Robein, Y., Pronsato, M. E., Brizuela, G., Di Nezio, M. S., & Centurión, M. E. (2021). Carbon dots structural characterization by solution-state NMR and UV–visible spectroscopy and DFT modeling. *Applied Surface Science*, 564, 150195.

[34] Krepper, G. (2018). Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación

de contaminantes en productos apícolas: empleo de sistemas electroquímicos. Tesis doctoral, Dpto Química, Universidad Nacional del Sur, Argentina.

[35] Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson Education Madrid.

[36] Babaei, A., Babazadeh, M., & Shams, E. (2007). Simultaneous determination of iron, copper, and cadmium by adsorptive stripping voltammetry in the presence of thymolphthalexone. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 19(9), 978-985.

[37] Sadeghi, S., & Ebadi, S. (2020). Sensitive quantification of Fe (III) in food samples at screen printed carbon electrode modified with graphene and piroxicam by catalytic adsorptive voltammetry. *Electroanalysis*, 32(9), 1983-1992.

[38] Segura, R., Toral, M. I., & Arancibia, V. (2008). Determination of iron in water samples by adsorptive stripping voltammetry with a bismuth film electrode in the presence of 1-(2-piridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, 75(4), 973-977.

CAPÍTULO

3.2

Sensor óptico basado en una matriz vítrea de óxidos de molibdeno, sodio y boro para la determinación rápida de azúcares reductores en muestras de miel

3.2.1. Objetivo

El objetivo de este capítulo es desarrollar un sensor óptico, utilizando partículas vítreas constituidas por óxidos de molibdeno, sodio y boro para la determinación de azúcares reductores en miel. Este sensor deberá ser simple, sensible, económico y ecológico.

3.2.2. Introducción

Dentro de los alimentos agropecuarios con alto contenido de azúcares, producidos y consumidos en Argentina, se encuentra la miel. Los azúcares presentes, principalmente los reductores, determinan el valor nutricional de la miel y se relacionan con varias características como son la madurez, la cristalización y la acidez. El tipo de azúcares presentes en las mieles y sus cantidades dependen principalmente del origen botánico y del ambiente en el que crece el recurso floral [1]. La relación del contenido de estos azúcares (fructosa/glucosa) influye en la cristalización de la miel, a menor contenido de fructosa las mieles cristalizan más rápido, fenómeno que afecta la aceptación por parte de los consumidores [2-3]. La acidez de la miel está relacionada con el contenido de glucosa, la cual se transforma en ácido glucónico debido a la presencia de glucosa oxidasa (enzima presente en la abeja) [4]. Por otro lado, la determinación de fructosa y glucosa es utilizada para describir la calidad y genuinidad de la miel, considerando que una disminución de estos azúcares puede deberse a adulteraciones con otros productos como son los jarabes de sacarosa o fructosa [5-6] como el JMAF (jarabe de maíz de alta fructosa) [7].

Para evaluar la madurez de la miel y prevenir el comercio de miel almacenada por un período prolongado o cosechado prematuramente, la legislación vigente establece que la miel de las flores de *Apis mellifera* debe contener al menos 60 g azúcares reductores en 100 g de miel (norma 12 año 1981 del Codex Alimentarius) [8] y 65 g de azúcares reductores como mínimo en 100 g de miel en el artículo 783 del capítulo 10 del CAA.

Dado que los azúcares reductores juegan un papel crucial en los procesos biológicos humanos, su concentración en los alimentos es una información sensible para la salud humana, por lo tanto, los métodos precisos y confiables para medir los niveles de glucosa son de suma importancia. Hoy en día existen excelentes técnicas analíticas para la determinación de estos hidratos de carbono presentes en la miel, como son la cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica de pulsos [9], cromatografía gaseosa [10], cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) [11],

resonancia magnética nuclear [12] o espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier [13]. Estas técnicas requieren instrumentos costosos, personal altamente capacitado y, además, generan sustancias residuales que requieren tratamiento previo a su disposición [14-18].

Como método espectrofotométrico, por ejemplo, el azul de molibdeno se emplea para la cuantificación de varias sustancias entre ellas: fósforo, arsénico, silicio, germanio y también, azúcares reductores [19-20] mediante el uso de reactivos de bajo costo, en comparación con otras técnicas analíticas. La reacción química entre los azúcares reductores y el molibdeno (VI), utilizada en diversos análisis para la detección y cuantificación de niveles de azúcares reductores como glucosa, implica la formación de quelatos o complejos de molibdeno mediante la interacción con los iones gluconato. Este método utilizaba generalmente molibdato de amonio y se basa en la reducción del molibdeno VI (Mo^{6+}) a molibdeno V (Mo^{5+}) con la posterior formación a pH ácido de un complejo de color azul con un máximo de absorción alrededor de 700 nm [21]. Sin embargo, los reactivos habituales son bastante específicos, caros y sus residuos no deben desecharse sin un tratamiento previo.

Por lo tanto, es importante desarrollar un método para cuantificar azúcares en alimentos que sea confiable, simple y de bajo costo pero que, también, supere las dificultades antes mencionadas.

3.2.3. Materiales y métodos

3.2.3.1. Reactivos y soluciones

Se utilizaron reactivos de grado analítico: MoO_3 (99,9 %, Cerac), Na_2CO_3 (99,9 %, Anedra Research AG. S.A) y B_2O_3 (99,9 %, Sigma-Aldrich). Para preparar las soluciones, se utilizó agua ultrapura (18 M Ω .cm). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las soluciones estándar de estos azúcares se prepararon mediante la dilución adecuada de la solución stock con 500 μL de 0,1 M de NaOH (para ajustar el pH a 11,0) hasta un volumen final de 10,0 mL con agua ultrapura.

Dos de las muestras de miel se obtuvieron de apicultores de localidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Stroeder e Hilario Ascasubi y las otras dos muestras se obtuvieron en comercios de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina (Figura 3.2.1). Las soluciones de miel se prepararon disolviendo 1,0 g de miel en 10,0 mL de agua bidestilada.



Figura 3.2.1. Fotografía muestras de miel estudiadas.

3.2.3.2. Instrumentación

Los patrones de difracción para la confirmación del estado vítreo del material obtenido se obtuvieron mediante un difractómetro PANalytical Empyrean 3 con una radiación Cu K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) filtrada con Ni y un detector PIXcel3D. Se operó a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. Los datos se recopilaron utilizando un modo de exploración continua con una rendija de divergencia FDS de 1/8 y FDS IBASS de 1/4°. Las condiciones de medida fueron: Step size: 0,01; Time per step: 80 s; Scan speed: 0,041683 en el rango de $3^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$. Las mediciones fueron realizadas sin monocromador.

Las propiedades térmicas del material obtenido se estudiaron mediante la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), empleando un calorímetro diferencial SDT Q600 V 20,9 Build 20. La rutina ensayada consistió en un calentamiento a una velocidad de 5°C/min desde 25°C hasta 400°C, en condiciones atmosféricas. La estabilidad térmica del material se determinó a través de un análisis termogravimétrico (TGA). En tal sentido, se empleó una rutina de calentamiento desde 22°C hasta 823°C con una velocidad de 5°C/min en condiciones atmosféricas.

El efecto Tyndall de la dispersión de partículas de vidrio en el medio elegido se observó con un puntero Láser Diodo de longitud de onda 625-680 nm que mide la dispersión de la luz en distintos medios.

Los espectros de la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) del material en estudio se obtuvieron con un espectrómetro FTIR-NIR Thermo Scientific Nicolet iS50 utilizando pastillas de KBr conteniendo aproximadamente 2 mg de muestra, el espectro se obtuvo a temperatura ambiente en un rango de 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} .

La morfología de las partículas del material sintetizado se analizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Para tal fin, se empleó un microscopio

electrónico JEOL JSM-35 CF, con detector secundario de electrones. La muestra se dispersó sobre tacos de bronce y se recubrió con una capa de oro.

El tamaño hidrodinámico de las partículas se obtuvo utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.) a 25 °C y los valores de potencial zeta se calcularon directamente mediante el software del instrumento utilizando la ecuación de Smoluchowski.

Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de celda de cuarzo Shimadzu (paso de luz de 10 mm). Los espectros UV-vis se registraron entre 450 y 850 nm, en pasos de 1 nm.

La reacción del Mo^{6+} con el sustrato vítreo disperso en solución alcalina para determinar azúcares reductores se llevó a cabo utilizando un microondas convencional.

3.2.3.3. Síntesis del material vítreo MNB

Se sintetizó un sistema vítreo cuya fórmula nominal es: 0,30 MoO_3 0,70 [0,2 Na_2O 0,8 B_2O_3] llamado MNB en referencia a los elementos que lo componen: molibdeno, sodio y boro. Este material se sintetizó mediante la técnica de melt-quenching [22]. El fundamento de la técnica es enfriar el material a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g) a una velocidad lo suficientemente alta como para inhibir el proceso de cristalización.

Los óxidos de molibdeno, sodio y boro, se colocaron en proporciones estequiométricas en un crisol de porcelana. Luego, el crisol se colocó en una mufla a velocidad de rampa de 10 °C/min hasta 850°C durante 5 horas. Se agitó esporádicamente para asegurar la homogeneización. La mezcla fundida se vertió en gotas sobre una placa de aluminio precalentada a 200°C. Estas gotas se templaron durante 2 horas y luego se dejaron enfriar.

3.2.3.3.1. Síntesis de los materiales MNB-C y MNB-C/Seco

Las partículas de pequeño tamaño obtenidas luego del fraccionamiento de las gotas de MNB, utilizando un molino de bolas, se dejaron a temperatura ambiente en una solución de NaOH 0,1 M por 48 h, lo que genera una dispersión estable muy viscosa, similar a un gel (denominado MNB-C), luego se lo dejó secar en estufa por 8 h, se morterea el material hasta obtener un polvo fino denominado MNB-C/Seco para su posterior uso como sustrato del sensor (Figura 3.2.2).

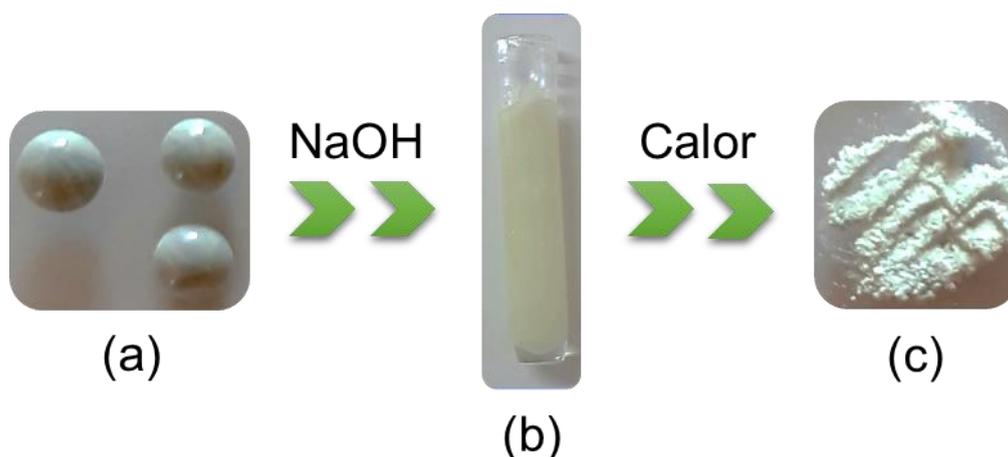


Figura 3.2.2. a) Fotografía del material vítreo MNB, b) la dispersión MNB-C y c) el material pulverizado seco MNB-C/Seco.

3.2.4. Resultados y discusión

3.2.4.1. Caracterización del material

Se realizaron las correspondientes caracterizaciones del material vítreo y sus modificaciones, hasta alcanzar el desarrollo del sensor espectrofotométrico de azúcares reductores en alimentos.

3.2.4.1.1. Efecto Tyndall

La mezcla de las partículas vítreas con la solución de NaOH, que inicialmente parece estar dispersa a simple vista, se examina utilizando un puntero láser. En este proceso, se puede observar la dispersión de un haz de luz, la cual se manifiesta como un efecto similar al de Tyndall. La mezcla acuosa originalmente incolora se vuelve amarillenta y opalescente por la formación de un material de aspecto gelatinoso (Figura 3.2.4 y 3.2.5).



Figura 3.2.4. Cubetas utilizadas con/sin MNB-C.

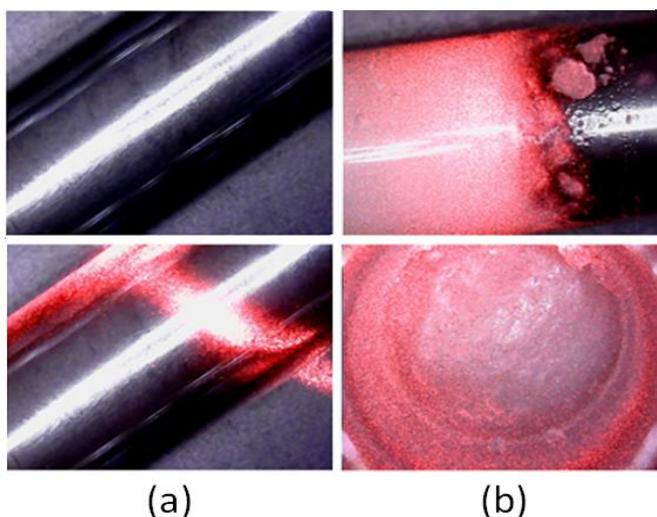


Figura 3.2.5. a) cubeta de vidrio vacía y b) cubeta de vidrio con material MNB-C.

3.2.4.1.2. Caracterización del comportamiento del vidrio con la temperatura

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un método de análisis que consiste en someter a la muestra a un programa de variación de temperaturas controlada [23].

El barrido de DSC para el material MNB-C en la Figura 3.2.6 muestra un pico endotérmico a baja temperatura que puede atribuirse a la pérdida de agua superficial, en tanto que los picos endotérmicos por encima de 100°C pueden atribuirse a sucesivas pérdidas de agua químicamente unida. Finalmente, a 514°C se observa la temperatura de transición vítrea (T_g) del vidrio estudiado.

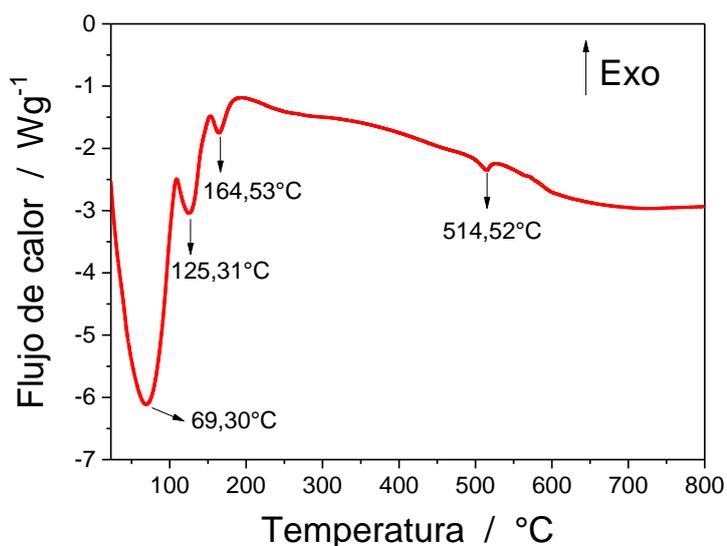


Figura 3.2.6. Barrido calorimétrico del material MNB-C.

La Figura 3.2.7 muestra el análisis termogravimétrico del material MNB-C que revela tres etapas a las siguientes temperaturas consistentes con los eventos térmicos mencionados anteriormente: 72°C , 122°C y 160°C . Al finalizar la tercera etapa se observa una disminución en la masa inicial de aproximadamente un 28 % debido a la evaporación de agua superficial. El residuo obtenido a 823°C bajo atmósfera de nitrógeno (para evitar los procesos oxidativos) es del 54 %.

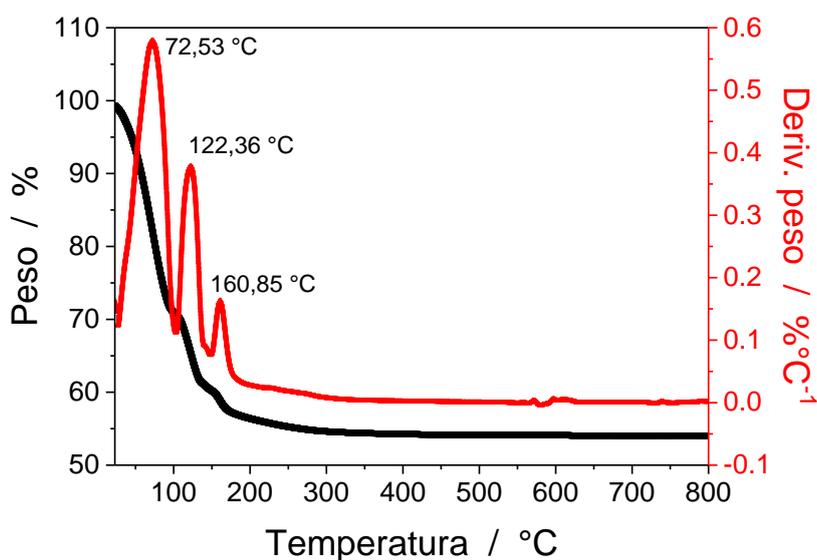


Figura 3.2.7. Curva TGA (línea negra) y su derivada (curva roja) para MNB-C.

3.2.4.1.3. Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Mediante el análisis de imágenes obtenidas por SEM se evaluó la morfología superficial del material MNB-C/Seco estudiado. En la Figura 3.2.8 se puede observar, la superficie lisa con la aparente cristalización que se origina luego del tratamiento del vidrio con la solución de NaOH 0,1 M y su posterior secado.

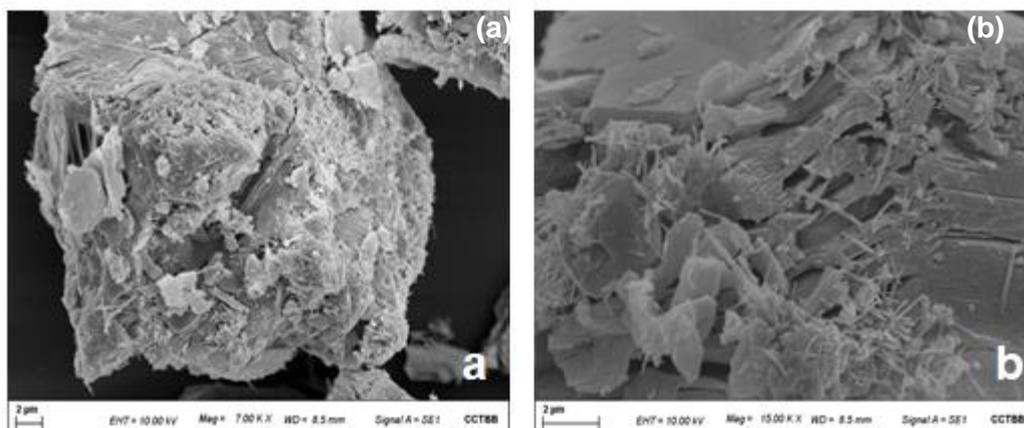


Figura 3.2.8. Imágenes de SEM de MNB-C/Seco con magnificación de a) 7000X y b) 15000X.

3.2.4.1.4. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 3.2.9 muestra el espectro FTIR del polvo seco (MNB-C/Seco) después de finalizar la etapa del tratamiento con NaOH y posterior secado. Las bandas del espectro observadas entre 1450 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento de las unidades $[\text{BO}_3]$ [24-26]. Las bandas entre 850 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento de las unidades $[\text{BO}_4]$ [25, 27-28] y las bandas entre 650 a 850 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de flexión de enlaces B–O–B [24, 26, 28]. Las bandas en 938 y $770\text{-}780\text{ cm}^{-1}$ pueden asignarse a las vibraciones de estiramiento de Mo=O y Mo–O respectivamente [29-30].

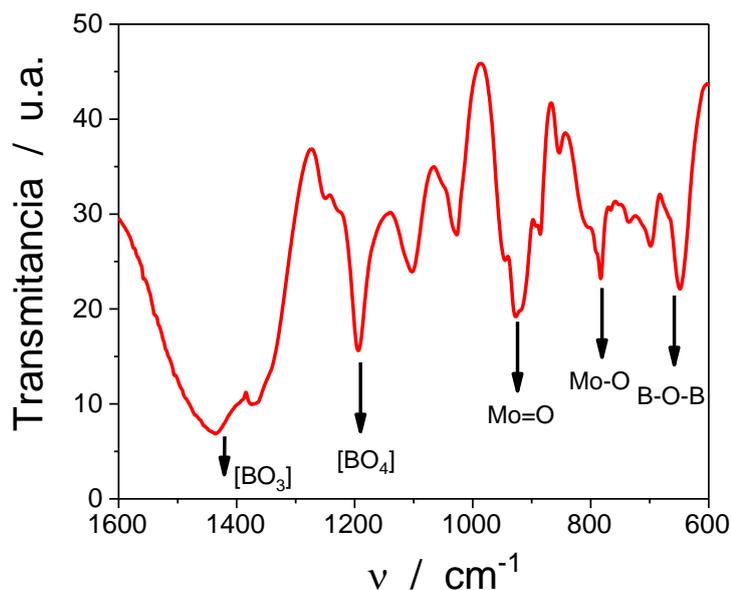


Figura 3.2.9. Espectro FTIR de MNB-C/Seco.

3.2.4.1.5. Potencial zeta y tamaño hidrodinámico

Se obtuvieron valores de potencial zeta para partículas de MNB-C/Seco antes (AM) y después (DM) de la disolución de NaOH y del tratamiento con microondas. En ambos casos se obtuvieron valores negativos de Zeta, AM = - 29,1 mV y DM = - 26,6 mV, demostrando que las partículas en suspensión presentan potenciales donde prevalecen las fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas manteniendo disperso el sistema. La Figura 3.2.10 muestra que antes del tratamiento con microondas hay presentes partículas pequeñas y grandes agregados de las mismas (270 nm y 2200 nm) observando una distribución bimodal que permite analizar solo la distribución de tamaños, por otro lado, después de aplicar el tratamiento de microondas, la muestra DM presenta una distribución monomodal, en este caso podemos analizar la distribución y también el radio hidrodinámico promedio calculado 248,5 nm. Estas partículas serán la clave para una reacción de color rápida y cuantitativa dada por la presencia de azúcares reductores.

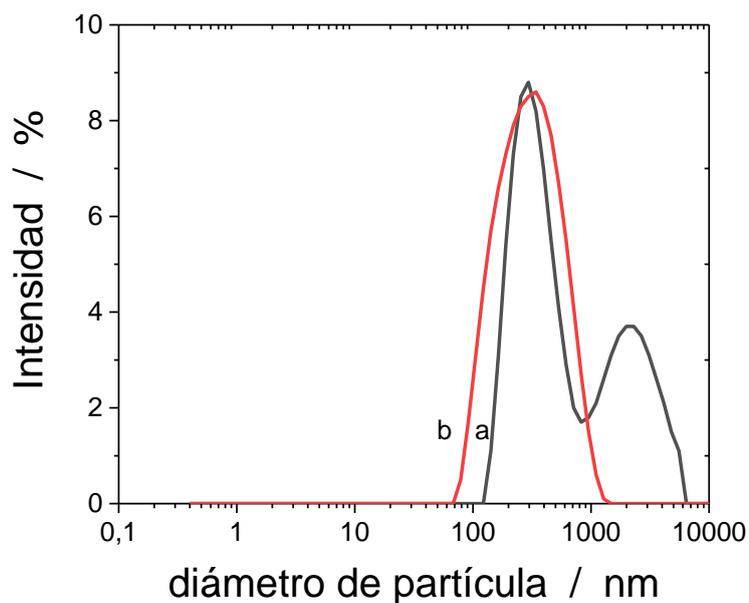


Figura 3.2.10. Tamaño hidrodinámico de las partículas. a) AM (antes del microondas) y b) DM (después del microondas).

3.2.4.1.6. Difracción de rayos X (XRD)

La Figura 3.2.11 muestra el difractograma del material MNB-C/Seco donde se confirma la mezcla de óxidos de molibdeno y boro. Los picos detectados demuestran el desarrollo de ciertas estructuras cristalinas que son consistentes con las bandas identificadas por FTIR. Se asignan los posibles compuestos mediante el análisis de los picos cristalográficos del material MNB-C/seco mediante el software Match! Phase Identification from Powder Diffraction:



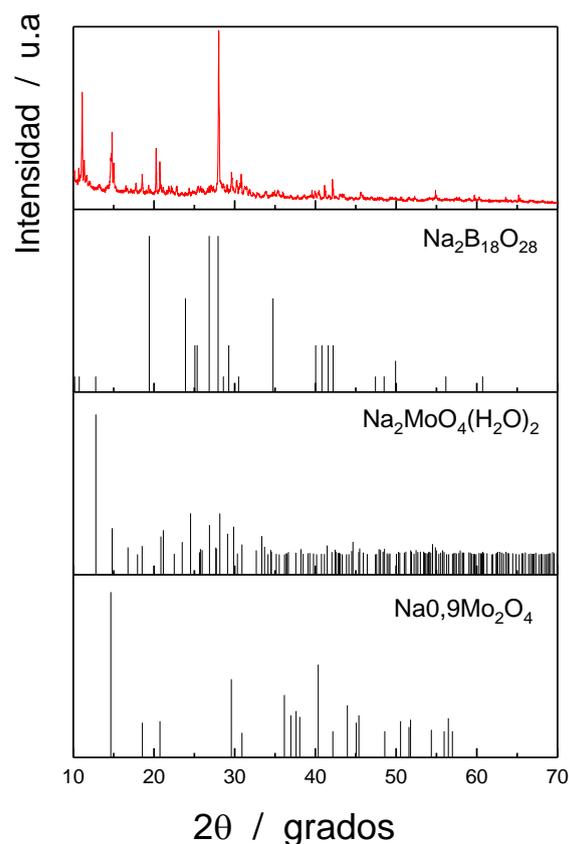


Figura 3.2.11. Análisis de los picos cristalográficos obtenidos en el patrón de difracción de Rayos X del sistema MNB-C/Seco.

3.2.4.2. Procedimiento

Para determinar azúcares reductores en cada muestra se mezclan 0,045 g de MNB-C/Seco con 2,0 mL de la solución de glucosa 1 gL^{-1} o un volumen apropiado de muestra de miel (pH 11,0 ajustado con 0,1M NaOH) en un tubo de rosca de vidrio. Se agita mediante vortex por 30 segundos y luego se introducen en el microondas a 350 W por 20 s como se indica en la Figura 3.2.12. Al retirar los tubos de vidrio del microondas, se dejan enfriar y se filtra la solución con filtros de jeringa de nylon (GVS, EE. UU.) de $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro. La reacción asistida por microondas da una solución azulada en presencia de agentes reductores. Esto se debe a que los aniones octadecaborato y molibdato del vidrio se dispersan en medio alcalino en presencia de la glucosa de la miel, y con aumento de temperatura forman un complejo azulado que absorbe a una longitud de onda de 689 nm. La dispersión del vidrio (MNB-C/seco) que contiene Mo^{6+} (de gran reactividad) se estabiliza por la presencia de los compuestos de boro. Finalmente, dado que el molibdeno se encuentra en exceso en el medio, es posible

que el complejo se forme con Mo^{6+} o Mo^{5+} ya que todos los iones metálicos con carga mayor a dos tienden a formar este tipo de estructura con el gluconato [30-33] que es lo que se quiere determinar, favoreciendo el equilibrio hacia la formación del complejo.

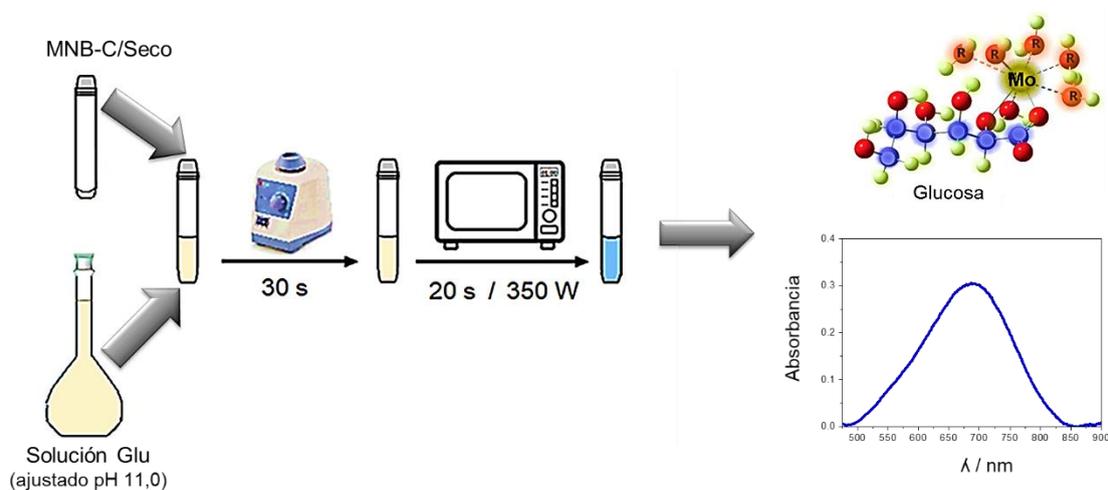


Figura 3.2.12. Proceso de reacción del método utilizando glucosa.

3.2.4.3. Optimización de las variables de preparación del sensor

La Metodología de Superficie de Respuesta, es una técnica para optimizar las respuestas cuando intervienen dos o más factores cuantitativos [34]. El uso de estas superficies basadas en el diseño de Box-Behnken, para optimizar la síntesis de diferentes materiales, presenta numerosas ventajas como la reducción del número de experimentos y de materiales y tiempo [35-36]. Este diseño experimental se lleva a cabo mediante diferentes pasos. En el primero se realizan experimentos diseñados estadísticamente. Luego se evalúan los coeficientes y se emplea un modelo matemático para evaluar la relación entre las respuestas y los factores. Finalmente se obtiene la respuesta óptima.

Las variables involucradas para la determinación de azúcares reductores (expresado como glucosa) empleando un diseño experimental Box-Behnken se estudiaron utilizando el software Minitab 19. Para ello se evaluaron la masa de MNB-C/Seco (g), la potencia (W) y el tiempo (s) del microondas. Se empleó como variable de respuesta el máximo de absorbancia a 685 nm trabajando con una concentración de glucosa de $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

Los niveles para todas las variables fueron seleccionados en base a estudios preliminares, donde se obtuvieron las condiciones y límites para cada factor (Tabla 3.2.1).

Con respecto a la masa en gramos de MNB-C/Seco se observó que valores mayores a 0,045 g provocan mayor turbidez en el medio de reacción dificultando la medida espectrofotométrica, por lo tanto, se seleccionó este valor como extremo superior. Respecto a la potencia y tiempo de funcionamiento del microondas, se observó que tanto valores de potencia mayores a 350 W como tiempos de reacción mayores a 30 s generaban mayor presión interna dentro del tubo de vidrio debido a mayor generación de vapor y por consiguiente mayor pérdida de material (burbujas) hacia el exterior del tubo de vidrio donde se producía la reacción. Por lo tanto, los valores óptimos hallados por el modelo fueron: 0,045 g de MNB-C/Seco, 350 W y 20 s.

Tabla 3.2.1. Valores experimentales de variables independientes en diseño Box-Behnken.

Variable independiente	Bajo	Medio	Alto
MNB-C/Seco (g)	0,0400	0,0425	0,0450
Potencia (W)	70	210	350
Tiempo (s)	20	25	30

Se llevaron a cabo en total 15 experimentos: 12 correspondientes al diseño en estrella y 3 al punto central. Las medidas se realizaron al azar para evitar errores sistemáticos y los resultados fueron analizados empleando ANOVA. Las condiciones experimentales para cada uno de los ensayos se detallan en la Tabla 3.2.2.

El gráfico de Pareto obtenido tras el análisis de los datos experimentales se presenta en la Figura 3.2.13 e indica los factores e interacciones que resultan importantes o estadísticamente significativos. Este análisis es una poderosa herramienta que permite evaluar la importancia de cada variable para mejorar la eficiencia de la determinación [37]. Se puede observar que la masa del MNB-C/Seco y la potencia del microondas con sus interacciones resultan significativas para un valor del nivel de significación de 0,05. Del análisis del gráfico de Pareto, la potencia y el tiempo presentan un efecto negativo sobre la absorbancia. Por lo contrario, el incremento de los valores de los gramos de MNB-C/Seco genera un aumento de absorbancia.

Tabla 3.2.2. Valores detallados de cada parámetro en estudio para los 15 experimentos involucrados en el diseño de optimización Box-Behnken.

Experimento	MNB-C/Seco (g)	Potencia (W)	Tiempo (s)
1	0,0450	210	20
2	0,0425	70	20
3	0,0425	210	25
4	0,0400	210	20
5	0,0425	210	25
6	0,0400	350	25
7	0,0400	210	30
8	0,0450	210	30
9	0,0450	70	25
10	0,0425	340	30
11	0,0400	70	25
12	0,0450	340	25
13	0,0425	70	30
14	0,0425	210	25
15	0,0425	340	20

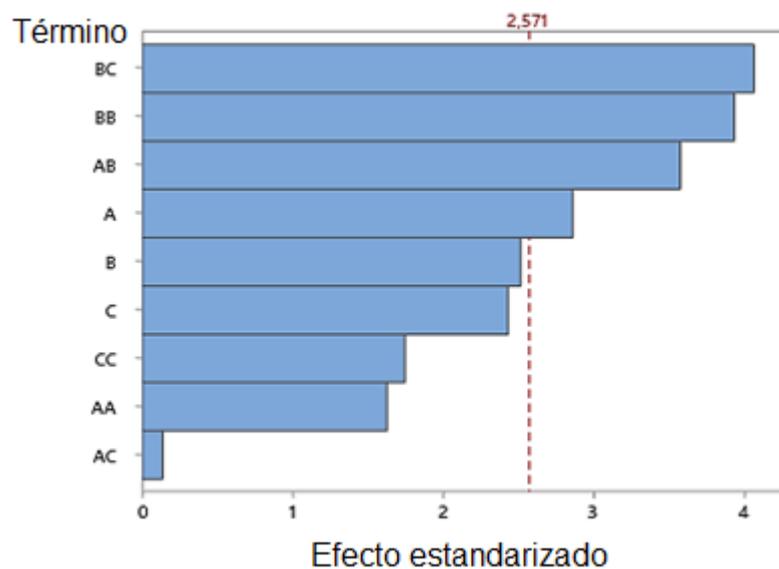


Figura 3.2.13. Diagrama de Pareto obtenido por el diseño de optimización del modelo Box-Benken para absorbancia como señal de respuesta. Donde A=MNB-C/Seco (g), B = Potencia (W) y C = tiempo (s). La línea vertical roja indica el nivel de significación $\alpha=0,05$.

Del diseño surge como resultado una superficie de respuesta representada por la ecuación (1):

$$A = -1,25 + 75,6 \cdot \text{MNB-C/Seco} - 0,001301 \cdot \text{potencia} - 0,0117 \cdot t - 987 \cdot \text{MNB-C/Seco} \cdot \text{MNB-C/Seco} + 0,000001 \cdot \text{potencia} \cdot \text{potencia} + 0,000266 \cdot t \cdot t + 0,0380 \cdot \text{MNB-C/Seco} \cdot \text{potencia} + 0,040 \cdot \text{MNB-C/Seco} \cdot t - 0,000022 \cdot \text{potencia} \cdot t \quad (1)$$

Donde A representa la absorbancia, t el tiempo de calentamiento en el microondas expresado en segundos, el peso de MNB-C/Seco en gramos y la potencia del microondas en Watts. Según la ecuación (1), el modelo se ajusta con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,941$ (en concordancia con un análisis de residuos) indicando un buen modelo de ajuste. Del análisis del diseño, la potencia y el tiempo presentan un efecto negativo sobre la absorbancia. Por lo contrario, el incremento de los valores de la masa de MNB-C/Seco genera un aumento de absorbancia.

Como se puede observar en la Figura 3.2.14, los valores óptimos seleccionados para las variables estudiadas corresponden a los valores máximos en las superficies de respuesta empleando el diseño Box-Behnken.

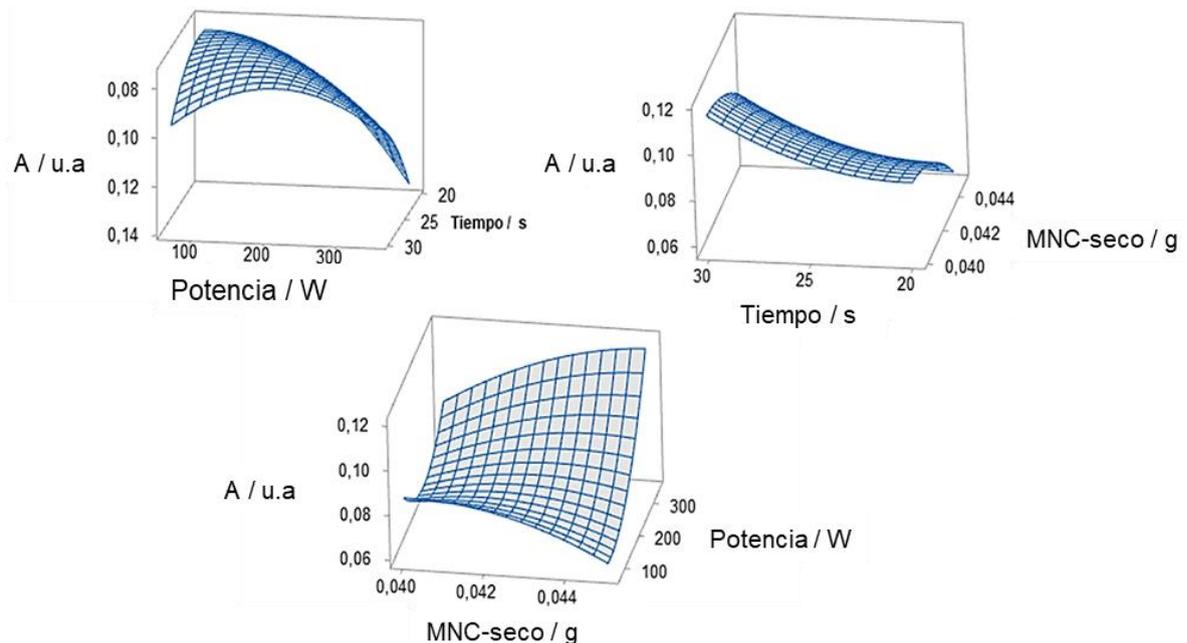


Figura 3.2.14. Diagramas de superficie de respuesta del modelo Box-Behnken.

3.2.4.4. Propiedades analíticas del método propuesto

Empleando espectrometría UV-Vis se trabajó a una longitud de onda de 689 nm. Se obtuvo un comportamiento lineal en el rango de 0,05 a 1,0 gL⁻¹ de glucosa (usada como estándar para azúcares reductores) bajo las condiciones experimentales determinadas. La curva de calibrado obtenida fue: $A = (0,015 \pm 0,007) + (0,717 \pm 0,027) \cdot C_{AR}$, donde A es la absorbancia y C_{AR} la concentración de azúcares reductores en gL⁻¹. El coeficiente de correlación (R²) obtenido fue de 0,993. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron 0,03 y 0,1 gL⁻¹ estimados como 3 y 10 veces S_{y/x}/pendiente respectivamente [38]. La repetibilidad fue del 8,02 %, calculada como el porcentaje de variación estándar relativa de 6 mediciones independientes de una solución de glucosa de 0,3 gL⁻¹. La Figura 3.2.15 muestra los espectros de absorción UV-Vis de diferentes concentraciones de glucosa en el rango de 500-850 nm para obtener la curva de calibrado que se muestra en la Figura 3.2.16.

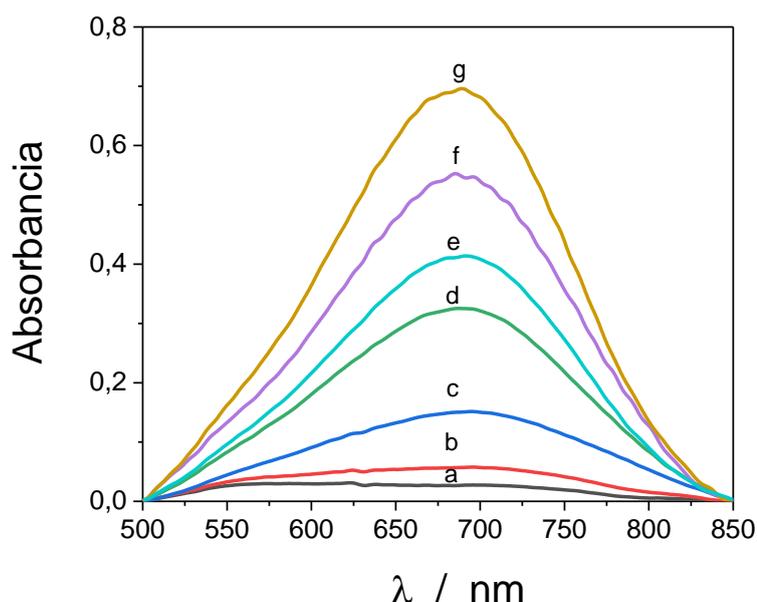


Figura 3.2.15. Espectros de absorción UV-vis del MNB-C/Seco para las concentraciones de glucosa a) 0,05 gL⁻¹, b) 0,1 gL⁻¹, c) 0,2 gL⁻¹, d) 0,4 gL⁻¹, e) 0,5 gL⁻¹, f) 0,8 gL⁻¹ y g) 1,0 gL⁻¹.

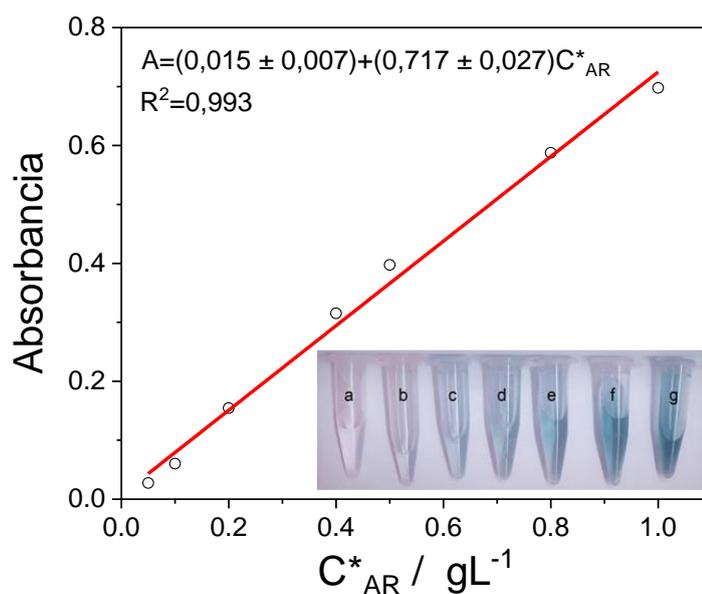


Figura 3.2.16. Curva de calibrado en condiciones experimentales seleccionadas.

3.2.4.5. Aplicación a muestras reales

El método propuesto se aplicó para determinar azúcares reductores (Glu y Fru) en cuatro muestras de miel, utilizando condiciones experimentales óptimas. Se analizaron muestras de miel por triplicado. El método propuesto se validó con el método de Fehling-Causse-Bonnans (FCB) [39-40]. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.2.3.

Tabla 3.2.3. Análisis de muestras reales por triplicado.

Muestras miel	Método propuesto (g _{AR} /100g _{muestra})	FCB* (g _{AR} /100g _{muestra})	Error relativo (%)
H1	72,1 ± 2,7	74,2 ± 4,1	-2,8
H2	79,0 ± 2,1	77,5 ± 3,2	+1,9
H3	74,8 ± 3,0	76,3 ± 2,1	-1,9
H4	73,7 ± 2,9	75,6 ± 3,4	-2,5

3.2.5. Conclusiones parciales

Se desarrolló un sensor óptico empleando un material vítreo de óxidos de molibdeno, sodio y boro. El fundamento de este sensor se basa en la formación de un complejo de coordinación de color azulado debido a la reducción del molibdeno en presencia de azúcares reductores cuando el material es sometido a la acción de microondas.

Se evaluó la funcionalidad del sensor determinando el contenido de azúcares reductores en muestras de miel comercial y los resultados obtenidos se compararon con el método de referencia Fehling-Causse-Bonnans (FCB), obteniéndose resultados satisfactorios. Además, los resultados demuestran que el contenido de azúcares reductores en las muestras cumple con las exigencias de composición mínima establecidas en el C.A.A. y en el Codex Alimentarius.

El sensor espectrométrico desarrollado con un material vítreo presenta una serie de ventajas: es un método sencillo y rentable en comparación con otras técnicas analíticas mencionadas anteriormente y con los ensayos enzimáticos. Además, no requiere equipamiento sofisticado y puede implementarse fácilmente en laboratorios de rutina.

3.2.6. Bibliografía

- [1] GUÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MIELES ARGENTINAS, ISBN 978-987-47099-2-9, 2019.
- [2] Zamora, M. C., & Chirife, J. (2006). Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*, 17(1), 59-64.
- [3] Venir, E., Spaziani, M., & Maltini, E. (2010). Crystallization in "Tarassaco" Italian honey studied by DSC. *Food chemistry*, 122(2), 410-415.
- [4] Barraza, C. A. H., Cantú, D. G. L., Osti, J. L., Garza, J. A. (2015). Análisis, calidad y procesamiento de los alimentos en México; Plaza y Valdés Editores; Madrid, España, 1a ed.
- [5] Puscas, A., Hosu, A., & Cimpoi, C. (2013). Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*, 1272, 132-135.
- [6] Özbalci, B., Boyaci, İ. H., Topcu, A., Kadılar, C., & Tamer, U. (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food chemistry*, 136 (3-4), 1444-1452.
- [7] Enghelmayer, M. A., Maldonado, L., Salomón, M. V., Álvarez, A. & Gaggiotti, M. (2022). La detección de las adulteraciones en la miel. Manual de buenas prácticas en alimentación de abejas, 1a ed. Centro de Investigación de Agroindustria INTA Castelar, Buenos Aires. Libro digital.
- [8] Braghini, F., Biluca, F. C., Schulz, M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C., & Fett, R. (2022). Stingless bee honey: A precious but unregulated product-reality and expectations. *Food reviews international*, 38 (sup1), 683-712.
- [9] Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bey, M. B., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food chemistry*, 121(2), 561-568.
- [10] De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., & Castro, I. M. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483-1489.
- [11] De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., & Castro, I. M. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483-1489.
- [12] Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2013). Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control*, 32(2), 543-548.
- [13] Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food chemistry*, 169, 218-223.

- [14] White, J. S., Hobbs, L. J., & Fernandez, S. (2015). Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *International Journal of Obesity*, 39(1), 176-182.;
- [15] Doner, L. W., Phillips, J. G., & Collaborators: Gearing JN Hillaire-Marcel C Parker PL Reeseman RM Smith BN Ziegler H. (1981). Detection of high fructose corn syrup in apple juice by mass spectrometric $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64(1), 85-90.
- [16] Gensberger, S., Mittelmaier, S., Glomb, M. A., & Pischetsrieder, M. (2012). Identification and quantification of six major α -dicarbonyl process contaminants in high-fructose corn syrup. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403, 2923-2931.;
- [17] Berriel, V., & Perdomo, C. (2016). Determination of high fructose corn syrup concentration in Uruguayan honey by ^{13}C analyses. *LWT*, 73, 649-653.
- [18] Herpai, Z., Szigeti, J., & Csapó, J. (2013). A rapid and sensitive method for the determination of high-fructose corn syrup (HFCS) in honey. *Acta Univ. Sapientiae Alimentaria*, 6, 5-13.
- [19] Hatanaka, C., & Kobara, Y. (1980). Determination of glucose by a modification of Somogyi-Nelson method. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(12), 2943-2949.
- [20] Myachina, M. A., Gavrilova, N. N., & Nazarov, V. V. (2018). Formation of molybdenum blue particles via the reduction of a molybdate solution with glucose. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 92, 2237-2241.
- [21] Acosta Leiva, J. (2019). Optimización del método Azul de molibdeno para la estimación del potencial antioxidante en productos naturales (Tesis de Licenciatura), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- [22] Di Pratula, P. E., Terny, S., Sola, M. E., & Frechero, M. A. (2017). Ionic conductivity enhancement achieved by the incorporation of ZnO in a lithium tellurite glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 461, 18-23.
- [23] Menczel, J.D., Judovits, L., Prime, R.B., Bair, H.E., Readin, M. and Swier, S. (2009) Differential Scanning Calorimetry (DSC). In: Menczel, J.D. and Prime, R.B., Eds., *Thermal Analysis of Polymers. Fundamentals and Applications*, Wiley, San Jose, 7-239.
- [24] Farag, H. K., & Marzouk, M. A. (2017). Preparation and characterization of nanostructured nickel oxide and its influence on the optical properties of sodium zinc borate glasses. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28, 15480-15487.
- [25] Mitrici, S., Rada, S., Culeaa, E., Pop, L., Popa, A., Bot, A., Macavei, S., Pana, O. & David, L. (2017). Nickel-lead-borate glasses and vitroceraamics with antiferromagnetic NiO and nickel-orthoborate crystalline phases. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 471, 349-356.

- [26] Ibrahim, S., Gomaa, M. M., & Darwish, H. (2014). Influence of Fe₂O₃ on the physical, structural and electrical properties of sodium lead borate glasses. *Journal of Advanced Ceramics*, 3, 155-164.
- [27] Kolavekar, S. B., Ayachit, N. H., Jagannath, G., NagaKrishnakanth, K., & Rao, S. V. (2018). Optical, structural and Near-IR NLO properties of gold nanoparticles doped sodium zinc borate glasses. *Optical Materials*, 83, 34-42.
- [28] Pavani, P. G., Sadhana, K., & Mouli, V. C. (2011). Optical, physical and structural studies of boro-zinc tellurite glasses. *Physica B: Condensed Matter*, 406(6-7), 1242-1247.
- [29] Frechero, M. A., Quinzani, O. V., Pettigrosso, R. S., Villar, M., & Montani, R. A. (2007). IR absorption spectra of lithium and silver vanadium–tellurite based glasses. *Journal of non-crystalline solids*, 353(30-31), 2919-2925.
- [30] Nikolić, V. D., Ilić, D. P., Nikolić, L. B., Stanojević, L. P., Cakić, M. D., Tačić, A. D., & Ilić-Stojanović, S. S. (2014). The synthesis and characterization of iron (II): Gluconate. *Savremene tehnologije*, 3(2), 16-24.
- [31] Ou, H. H., Tran, Q. T. P., & Lin, P. H. (2018). A synergistic effect between gluconate and molybdate on corrosion inhibition of recirculating cooling water systems. *Corrosion Science*, 133, 231-239.
- [32] Kutus, B., Varga, N., Peintler, G., Lupan, A., Attia, A. A., Pálkó, I., & Sipos, P. (2017). Formation of mono-and binuclear neodymium (III)–gluconate complexes in aqueous solutions in the pH range of 2–8. *Dalton Transactions*, 46(18), 6049-6058.
- [33] Mavani, N. R., Ali, J. M., Othman, S., Hussain, M. A., Hashim, H., & Rahman, N. A. (2022). Application of artificial intelligence in food industry—a guideline. *Food Engineering Reviews*, 14(1), 134-175.
- [34] Kolavekar, S. B., Ayachit, N. H., Jagannath, G., NagaKrishnakanth, K., & Rao, S. V. (2018). Optical, structural and Near-IR NLO properties of gold nanoparticles doped sodium zinc borate glasses. *Optical Materials*, 83, 34-42.
- [35] Aguilera, Á. Y., Di Nezio, M. S., & Springer, V. (2023). Microwave-assisted synthesis of copper oxide particles and its application for determination of imazapyr in environmental samples. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1-11.
- [36] Ba-Abbad, M. M., Chai, P. V., Takriff, M. S., Benamor, A., & Mohammad, A. W. (2015). Optimization of nickel oxide nanoparticle synthesis through the sol–gel method using Box–Behnken design. *Materials & Design*, 86, 948-956.
- [37] Aziz, A., Driouich, A., Bellil, A., Ali, M. B., Mabtouti, S. E., Felaous, K., Achab, M., & El Bouari, A. (2021). Optimization of new eco-material synthesis obtained by phosphoric acid attack of natural Moroccan pozzolan using Box-Behnken Design. *Ceramics International*, 47(23), 33028-33038.

[38] Miller, J. y Miller, J., (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. 4 ed. Madrid: Pearson Educación S.A. ISBN:84-205-3514-1.

[39] Apablaza, O., Basilio, A. M., Ciappini, M. C., Fagundez, G. A., Gaggiotti, M. D. C., Gutiérrez, A., Salgado, C. R., & Winter, J. (2019). Guía para la caracterización de mieles argentinas.

[40] Fechner, D. C., Moresi, A. L., Díaz, J. D. R., Pellerano, R. G., & Vazquez, F. A. (2016). Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties. *Food Bioscience*, 15, 49-54.

CAPÍTULO

4

BIOSENSORES

CAPÍTULO

4.1

Biosensor visual basado en micropartículas vítreas de silicato comercial para la determinación de glucosa

4.1.1. Objetivo

En este trabajo se propone un método innovador para anclar la enzima glucosa oxidasa sobre un sustrato inorgánico de micropartículas de vidrio silicato comercial que posibilite el desarrollo de un nuevo biosensor visual, económico y de bajo impacto ambiental, para la detección de glucosa.

4.1.2. Introducción

La tendencia actual en diversas ciencias, tales como biológicas, toxicológicas, de alimentos, medioambientales entre otras, es el empleo de sistemas analíticos de respuesta rápida, que requieran un tratamiento de muestras sencillo, como así también, permitan realizar la detección y/o cuantificación de diferentes analitos. Por ello, el desarrollo de sensores, basados en métodos de screening constituye una herramienta fundamental debido a que permite realizar diferentes determinaciones en tiempo real, como así también pueden automatizarse y miniaturizarse lo que conlleva a una simplificación del procedimiento realizado [1-3].

Una buena alternativa a la determinación de diversos analitos es la utilización de sensores visuales que permiten observar un cambio de color frente a un estímulo químico/bioquímico y, además, presenten un potencial para realizar técnicas analíticas de laboratorio, teniendo en cuenta que las metodologías tradicionales son laboriosas y requieren tiempos elevados de análisis. Entre este tipo de sensores visuales es importante considerar a los biosensores, ya que son dispositivos con alta selectividad y permiten mayores aplicaciones fundamentalmente en química analítica [4].

Un biosensor es una herramienta analítica utilizada para el reconocimiento de un analito o un grupo de analitos que reacciona con un sistema biológico y/o biomoléculas (como tejidos, microorganismos, organelos celulares, enzimas, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, proteínas, aptámeros, compuestos biomiméticos, catalizadores sintéticos, moléculas conjugadas y polímeros impresos, entre otros) asociados a un transductor fisicoquímico o microsistema de transducción que puede ser óptico, electroquímico, termométrico, piezoeléctrico o magnético [5-6].

En cuanto al desarrollo de biosensores enzimáticos capaces de sensar la actividad catalítica de enzimas con sus respectivos sustratos, es de gran interés la enzima glucosa oxidasa (GOx), la cual, permite la determinación cuantitativa de glucosa (Glu) en fluidos corporales, alimentos, bebidas y licores de fermentación [7]. La ventaja de los métodos enzimáticos es su selectividad, aunque presentan la desventaja de su alto costo. Por ello, para superar tal inconveniente es necesario reutilizar la enzima. Para

que las enzimas queden adheridas al sensor deben inmovilizarse. Los principales componentes de un sistema de inmovilización enzimática son la enzima, el soporte y el método de fijación (Figura 4.1.1). Los métodos más comunes son la adsorción, el atrapamiento, y la unión covalente a un soporte. La inmovilización por unión covalente se basa en el entrecruzamiento de la enzima y el material del soporte produciendo un enlace fuerte y estable. El enlace covalente es formado entre el grupo funcional del soporte y la superficie de la enzima que contiene residuos de aminoácidos. La unión covalente de la enzima con el material del soporte requiere de dos pasos: la activación del material, que se lleva a cabo por la adición de un compuesto reactivo, y el segundo, es la modificación del esqueleto de la sustancia utilizada para activar ese soporte. El paso de activación produce un grupo electrofílico en el material del soporte y de esta forma reacciona con los nucleófilos [8].

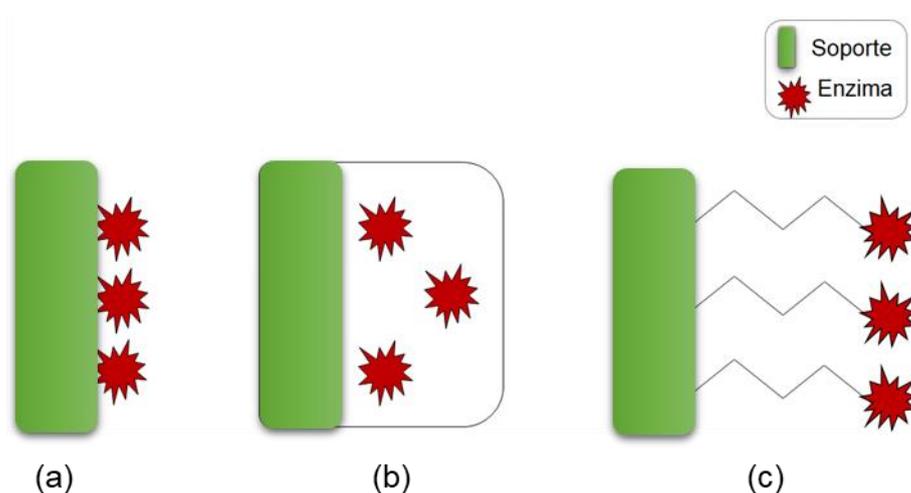


Figura 4.1.1. Componentes de un sistema de inmovilización: enzima, soporte y técnica de inmovilización; los métodos más comunes son (a) adsorción física, (b) atrapamiento y (c) unión covalente.

Una gran cantidad de materiales inorgánicos como el vidrio y los geles de sílice pueden ser empleados como materiales de soporte para los procesos de inmovilización de enzimas. Varias son las ventajas que estos materiales pueden presentar, por ejemplo, alta resistencia térmica y marcada rigidez. Además, son inertes a la degradación por los microorganismos [9].

Uno de los agentes más utilizados para modificar y funcionalizar la superficie de los sustratos de sílice (SiO_2) es el 3-aminopropiltriectxisilano (APTES) o 3-aminopropiltris metoxi-etoxi-etoxi silano (APTMEES). Estas son sustancias que permiten el acoplamiento del organosilano a grupos amino químicamente reactivos ($-\text{NH}_2$) a sustratos basados en silicio (Figura 4.1.2).

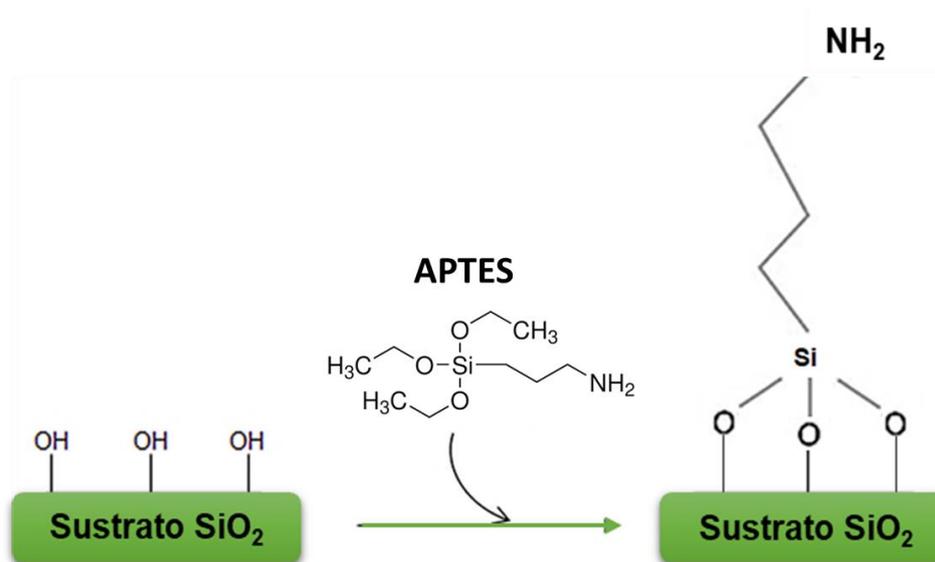


Figura 4.1.2. Representación esquemática del mecanismo de unión APTES a la superficie del sustrato de sílice.

A pesar de los muchos trabajos en los que utilizan APTES, existe controversia sobre la orientación de sus moléculas en la superficie de sílice después de la funcionalización y su estabilidad química en solución acuosa [10]. Además, estos silanos presentan la desventaja de ser costosos [11]. W Limbut y *col.* propusieron un método para inmovilizar ureasa sobre tres soportes diferentes basados en SiO_2 para la determinación de urea [12] y mostraron la alta eficiencia de dicha interacción.

Partiendo de los estudios previos arriba citados, en este trabajo se buscó utilizar otros precursores con grupos amino disponibles (como por ejemplo la urea) para la funcionalización de la superficie del sustrato de sílice que sea económico, sencillo de implementar y amigable con el medio ambiente para el desarrollo de un biosensor visual para la detección de glucosa en muestras de miel.

4.1.3. Materiales y métodos

4.1.3.1. Reactivos y soluciones

Las soluciones se prepararon utilizando agua tridestilada ($<1 \mu\text{S}/\text{cm}$). Urea (99,97 %, Mallinckrodt), solución de glutaraldehído grado II (Sigma-Aldrich) 25 % m/v en agua, solución buffer de fosfato 0,1 M pH 6,80, soluciones de glucosa (Sigma-Aldrich): se prepararon disolviendo la cantidad apropiada en 10,0 mL de agua. Se utilizó 4-aminofenazona 25 mM en buffer tris 0,92 M; solución de fenol 55 mM; solución de glucosa oxidasa (1000 U/mL); peroxidasa (120 U/mL).

4.1.3.2. Instrumentación

La identificación de los compuestos presentes en los materiales vítreos se efectuó mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), empleando un equipo Nicolet Nexus FTIR trabajando a temperatura ambiente en el rango 3500 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Esto permite caracterizar el vidrio silicato y las micropartículas vítreas modificadas, previamente molidos hasta obtener polvos finos y dispersados en KBr.

La caracterización estructural de los sistemas vítreos se llevó a cabo a 25°C mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX) en polvo, utilizando un equipo Bruker D8 advance en modo de escaneo continuo con ánodo de cobre y barrido en el rango 2θ de 10° a 60° . En todos los análisis se empleó una tensión de 45 kV y una potencia de 30 mA.

El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas se obtuvo utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.) a 25°C y los valores de potencial Zeta fueron calculados directamente por el software del instrumento utilizando la ecuación de Smoluchowski.

4.1.3.3. Procedimiento para el desarrollo del sensor visual

Para la preparación del nuevo material que será utilizado como sensor visual de glucosa, se empleó como sustrato sólido inorgánico un vidrio de silicato comercial con elevada temperatura de transición vítrea (T_g). Este material fue molido empleando un molino de bolas y el polvo obtenido se tamizó con una malla de 150 mesh (Sigma Aldrich). De esta forma se obtienen las micropartículas de vidrio, en donde la GOx quedará inmovilizada. Para ello se emplea como sistema de anclaje una solución de urea.

En la Figura 4.1.3 se muestra un esquema completo del procedimiento experimental efectuado. La Figura 4.1.4 ilustra la síntesis del sensor visual propuesto desarrollada en las siguientes etapas:

- a. Las micropartículas de vidrio se dejaron en reposo en una disolución de NaOH 1M durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtró por gravedad utilizando papel Whatman N°3 como se observa en la etapa (I) de la Figura 4.1.3. La fracción sólida retenida en el papel se lavó con agua tres veces hasta obtener un líquido de lavado de pH neutro. La misma se secó en una estufa a 75°C durante 3 horas.
- b. Como se observa en la etapa II (Figura 4.1.3 y 4.1.4), el polvo seco resultante se sonicó durante 30 minutos (160 W) en una disolución de urea

6,95 M. Esta dispersión se filtró nuevamente, se lavó con agua y se secó en estufa a 75°C por 3 horas. Este tratamiento permitió generar los sitios de anclaje en su superficie. Las micropartículas tratadas se agitaron durante 2 horas en una disolución de glutaraldehído (10 % m/m) a temperatura ambiente (etapa III de las Figuras 4.1.3 y 4.1.4) para generar los enlaces covalentes entre los grupos aminos del glutaraldehído y de la enzima. Finalmente, se filtró nuevamente con un papel Whatman N°3 y se lavó varias veces con buffer fosfato pH 6,8 hasta que el líquido de lavado conservó el pH. La fracción sólida retenida en el papel filtro, se secó a 75°C durante 3 horas.

- c. Finalmente, en la etapa IV (Figura 4.1.3 y 4.1.4), las partículas vítreas modificadas del inciso b) se trataron con la disolución glucosa oxidasa. Para ello, 1,00 g de partículas vítreas modificadas y 2 mL de la solución de enzima se sonicaron durante 30 min utilizando un gel refrigerante para evitar el calentamiento y preservar la actividad enzimática. Para finalizar el proceso de preparación, el sistema se lavó con buffer fosfato pH 6,8 y se almacenó a 4°C en un frasco cerrado.

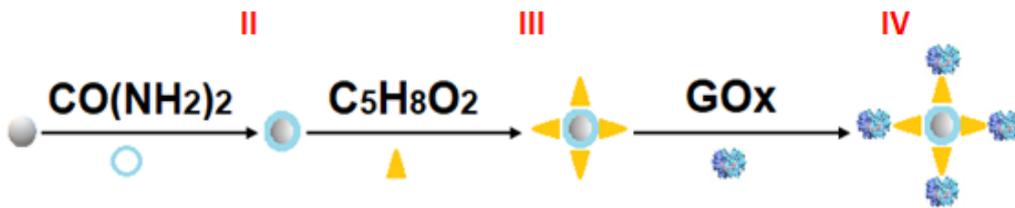


Figura 4.1.3. Esquema de las etapas de modificación.

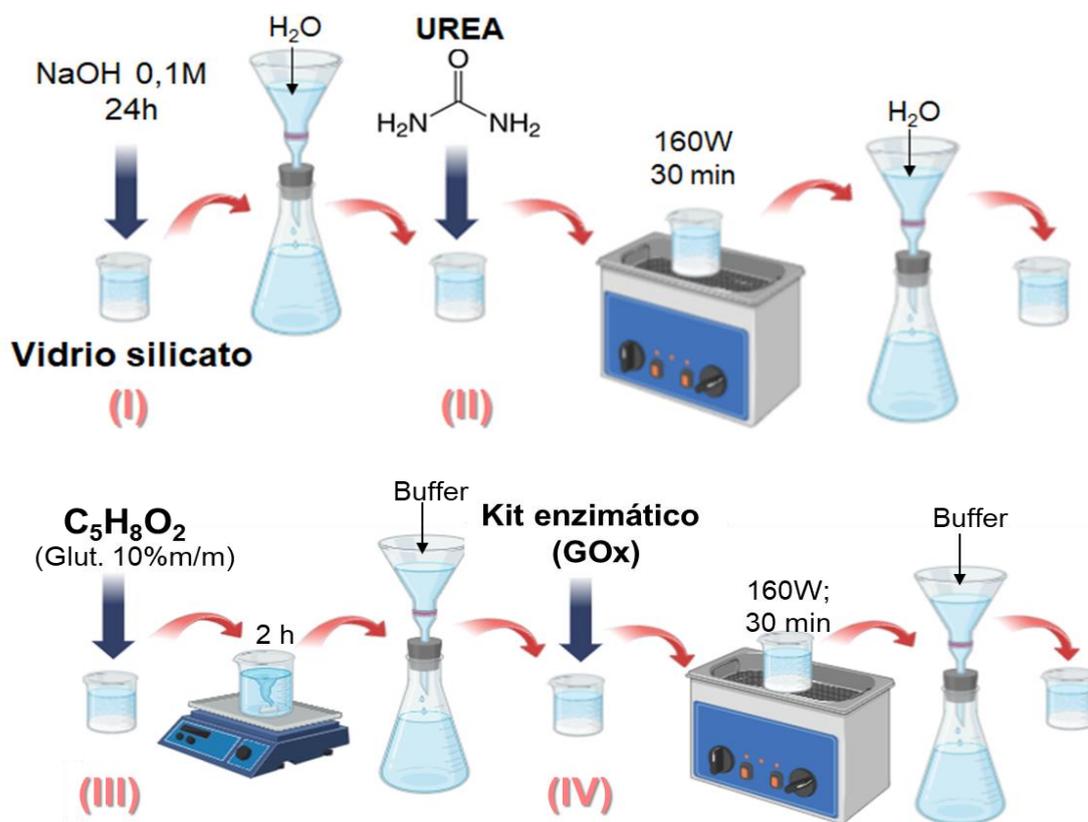


Figura 4.1.4. Esquema del método de preparación.

4.1.4. Resultados y discusión

4.1.4.1. Caracterización de los materiales vítreos

Se realizaron las caracterizaciones del material vítreo de silicato comercial en las diferentes etapas de modificación, con la finalidad de establecer sus propiedades como sustrato inorgánico del sensor visual.

4.1.4.1.1. Espectroscopía FTIR

La Figura 4.1.5 muestra el espectro FTIR del vidrio de silicato y de las micropartículas vítreas con la disolución de urea después de finalizar la etapa II es decir, partículas vítreas donde los enlaces N-H se han fijado a la superficie del vidrio para recibir las moléculas de glutaraldehído. Las bandas observadas están entre 3500 cm^{-1} - 3400 cm^{-1} y 1560 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} en el espectro y permiten afirmar el anclaje exitoso en la superficie del grupo amida [13]. Las bandas entre 800 cm^{-1} y 1169 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de enlaces silicio-oxígeno (por flexión y estiramiento).

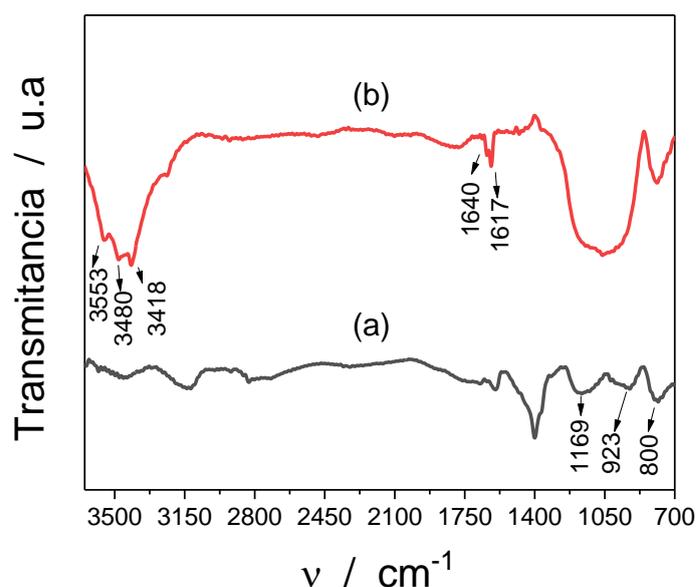


Figura 4.1.5. Espectro FTIR del a) vidrio de silicato y las b) micropartículas vítreas con disolución de urea después de terminar la etapa II.

4.1.4.1.2. Difracción de rayos X

La Figura 4.1.6 muestra los patrones de difracción de rayos X de las partículas de vidrio después de los tratamientos II y IV. El difractograma de rayos X del material luego de ambos tratamientos, no muestra la presencia de picos agudos e intensos, lo que demuestra la naturaleza amorfa del material confirmando la ausencia de estructuras cristalinas. Las bandas anchas son consecuencia de la ausencia de un ordenamiento reticular del material, sus iones están dispuestos irregularmente formando una estructura más o menos distorsionada, debido a las condiciones de enfriamiento en que tuvo lugar su formación y no pudieron ordenarse con la regularidad geométrica de un cristal [14].

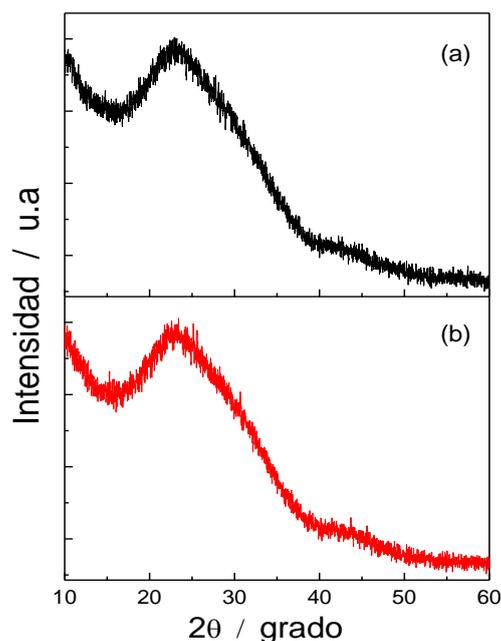


Figura 4.1.6. Patrones de difracción de rayos X de partículas vítreas después de los a) tratamientos II y b) IV.

4.1.4.1.3. Potencial zeta y tamaño hidrodinámico

El fenómeno de adsorción en una superficie es la capacidad de los sustratos sólidos para atraer algunas moléculas y iones del medio. Tales fenómenos pueden ser de naturaleza física o química. La primera, se debe sobre todo a las fuerzas de van der Waals y a las fuerzas electrostáticas existentes entre las moléculas adsorbidas y los átomos del sustrato o adsorbente [15]. Las propiedades, el comportamiento de la superficie del sustrato y su naturaleza química se ven fuertemente afectados por la carga superficial determinada por el potencial Zeta (ξ) proporciona una comprensión de su comportamiento químico en función del medio, ya que la interacción con los iones externos depende tanto de las características de los iones en superficie como de las propiedades de la superficie. Por lo tanto, tanto los iones presentes en la estructura de la superficie como los iones adsorbidos del líquido van a tener un efecto en la medición, y esto se puede observar a través del efecto del pH. Los protones tienden a ser adsorbidos en una superficie cargada negativamente, lo que resulta en una interfaz entre líquido y superficie más neutra (menos negativa). Cuando el valor de pH es lo suficientemente bajo, la alta concentración de protones puede causar un exceso de carga positiva en la interfaz entre la superficie y el líquido, lo que resulta en un potencial zeta netamente positivo [16].

La magnitud del potencial zeta define la estabilidad de una suspensión. Si todas las partículas suspendidas tienen alto potencial, positivo (+ 25 mV) o negativo (- 25 mV), las fuerzas de repulsión electrostática prevalecen, manteniéndose el sistema disperso. Sin embargo, si el potencial Zeta tiene valores bajos cercanos a cero, prevalecerán las fuerzas de atracción de van der Waals y las partículas se agregan [17].

Teniendo en cuenta el primer paso del método, empleando una modificación de las partículas del vidrio con una disolución de 1M de NaOH, se midió la carga superficial para asegurar las condiciones necesarias para dar lugar al anclaje en etapas (III) y (IV). Se confirmó la densidad de carga superficial por potencial zeta para las partículas vítreas utilizando como medio agua tridestilada (-33,3 mV) y utilizando 0,1 M buffer fosfato pH 6,8 (-16,9 mV) [18]. En la Figura 4.1.7 se muestra la distribución del tamaño de las partículas estudiadas.

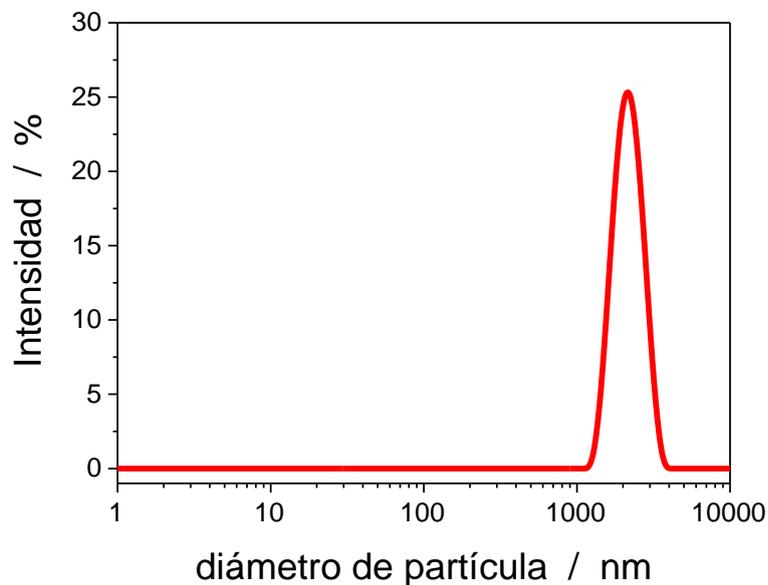
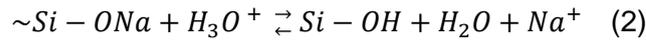
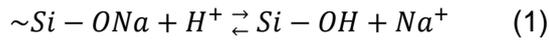


Figura 4.1.7. Distribución del tamaño de partículas por dispersión láser.

4.1.4.2. Mecanismo de fijación al sustrato

Cuando una película de solución está sobre una superficie de vidrio de silicato (~Si) se inducen dos reacciones químicas diferentes, reguladas por el pH [19-20]. Cuando el pH es inferior a 9, se produce un proceso de lixiviación que resulta en un intercambio iónico [21-22] donde los iones alcalinos del vidrio se intercambian por H^+ o H_3O^+ , lo que aumenta si el pH es superior a 9 [23], como puede observarse en las siguientes ecuaciones:



En la condición de pH regulado a 6,8 estas reacciones se rigen por la difusión de iones en el vidrio siguiendo la primera ley de Fick hasta que se alcanza el estado estacionario y el espesor de la capa modificada sobre la superficie permanece constante. La superficie del silicato hidratado es en sí misma una nueva fase amorfa como lo confirma los resultados de la Figura 4.1.6; esta nueva fase permite la reacción con la urea dando los grupos aminos para permitir el enlace covalente con las moléculas de glutaraldehído (Figura 4.1.9) y, por tanto, construyendo los anclajes sobre la superficie de la partícula vítrea. Ahora, estas partículas vítreas modificadas pueden fijar la estructura de la GOx a su superficie (etapa IV de la Figura 4.1.4).

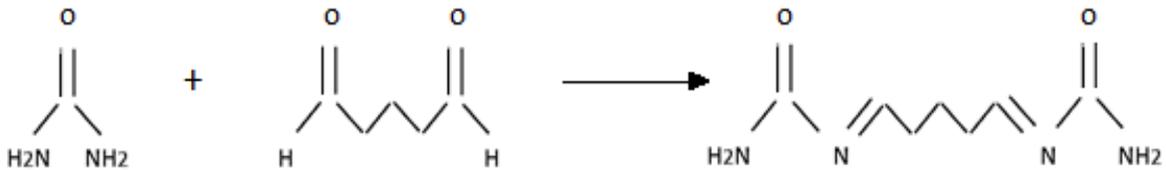
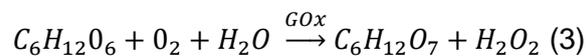


Figura 4.1.8. Reacción de entrecruzamiento entre urea y glutaraldehído.

4.1.4.3. Evaluación del desempeño del biosensor visual

El biosensor visual desarrollado se enmarca dentro de los llamados sistemas de screening directo que permiten evaluar si una muestra tiene una concentración del analito en estudio superior respecto a una preestablecida. Teniendo en cuenta que este sensor se basa en una reacción química y permite evaluar el analito selectivamente, el diseño de los denominados *test kits* podría llevarse a cabo.

Se estudió la eficiencia del material desarrollado evaluando visualmente el cambio de color del mismo de blanco a rosado en presencia de glucosa. Este cambio de color está basado en dos reacciones acopladas. En una primera etapa la glucosa oxidasa (GOx) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, generando peróxido de hidrógeno (Ec. 3). Posteriormente, el peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa (POD) y fenol 4-aminofenazona (4-AF), (Ec. 4) genera el desarrollo de color, cuya intensidad está relacionada con la concentración de glucosa.



Para llevar a cabo la evaluación del biosensor, se colocaron sobre una placa de toque 0,1 g de sensor preparado y 5µL de disoluciones de diferentes concentraciones de glucosa (0,25 gL⁻¹, 0,4 gL⁻¹, 0,6 gL⁻¹, 1,0 gL⁻¹ y 1,5 gL⁻¹), trabajando a temperatura ambiente. Empleando una concentración de glucosa de 0,25 gL⁻¹ no se observó desarrollo de color. Sin embargo, se obtuvo una coloración rosada en las disoluciones de concentración 0,4, 0,6 y 1,0 gL⁻¹ que indica una reacción positiva a la presencia de glucosa. Trabajando con la solución de glucosa 1,5 gL⁻¹ el color desarrollado es de mayor intensidad. A modo de ejemplo se muestra una foto del desarrollo de color del biosensor con concentraciones de glucosa [gL⁻¹] estudiadas con 0,1 g biosensor (Figura 4.1.9).



Figura 4.1.9. Concentraciones de glucosa [gL⁻¹] estudiadas con 0,1 g biosensor.

Por otro lado, y con la finalidad de emplear la menor cantidad de biosensor para llevar a cabo la determinación se probaron 0,1, 0,2 y 0,5 g de biosensor sólido, observándose que 0,1 g es suficiente para apreciar el cambio de color y que cantidades menores no permiten visualizar dicho cambio (Figura 4.1.10).

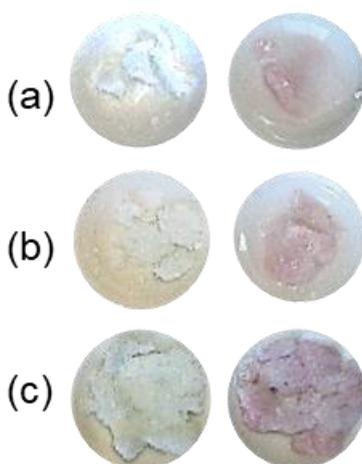


Figura 4.1.10. Reacción glucosa 1 gL⁻¹ en a) 0,1 g biosensor, b) 0,2 g de biosensor y c) 0,5 g de biosensor.

Asimismo, se evaluó el tiempo de desarrollo de color entre el agregado de glucosa. Este estudio demostró que a partir de los 60 s se evidencia una coloración rosado que se intensifica hasta los 120 s y a partir de este tiempo la coloración permanece inalterable durante 2 h (Figura 4.1.11). Luego de ese tiempo, la coloración se vuelve más amaronada producto de la oxidación del material con la glucosa.

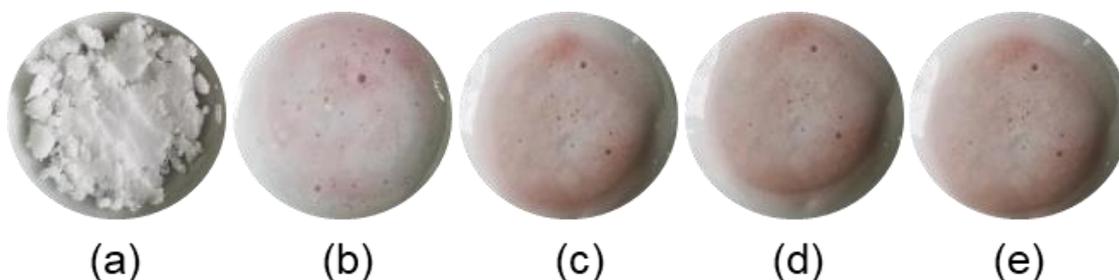


Figura 4.1.11. (a) Biosensor sin glucosa. Reacción visual del biosensor con glucosa 1gL^{-1} a (b) 60 s, (c) 120 s, (d) 180 s y (e) 2 h.

Con la finalidad de poder utilizar este biosensor como detector de glucosa en muestras de alimentos, se evaluó su desempeño en una muestra de miel. Para ello, se seleccionó una muestra proveniente de un apiario de la región de Bahía Blanca, con un contenido de glucosa de 35,1 % m/m [24]. Se observa una reacción positiva al evaluar el biosensor en presencia de una solución acuosa de miel $1,0\text{gL}^{-1}$ (Figura 4.1.12).

Finalmente se estudió la estabilidad del sensor durante tres meses, observándose el desarrollo de color rosado característico por la presencia de glucosa, posibilitando una alternativa de uso comercial de este biosensor.

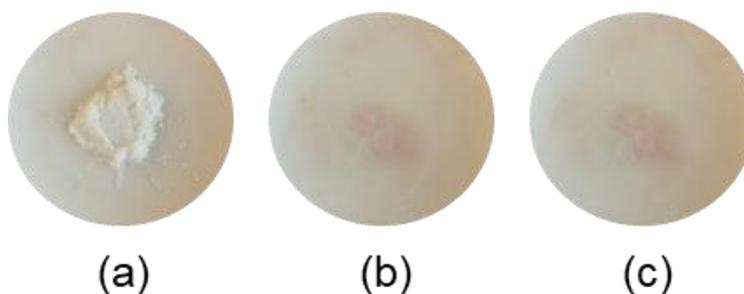


Figura 4.1.12. a) Biosensor sólido; b) Biosensor más disolución de miel 1gL^{-1} a 60 s; c) Biosensor más disolución de miel 1gL^{-1} a 120 s.

4.1.5. Conclusiones parciales

En este capítulo se describió el desarrollo de un nuevo procedimiento para anclar glucosa oxidasa sobre micropartículas de vidrio de silicato comercial utilizando urea en reemplazo de los reactivos convencionalmente empleados como el APTES y otros similares. Esto permitió construir un biosensor visual para llevar a cabo un método rápido de screening, económico y amigable con el medio ambiente, que permite realizar medidas de carácter cualitativo analizando un gran número de muestras en un breve periodo de tiempo.

El biosensor visual propuesto desarrolla una reacción positiva a partir de 60 s intensificando su color hasta los 120 s, tiempo adecuado para realizar la lectura del mismo. Esta coloración permanece constante durante 2h. Por otro lado, permite detectar concentraciones de glucosa iguales o superiores a $0,4 \text{ gL}^{-1}$. Esta determinación se realiza a temperatura ambiente a diferencia del método enzimático que requiere un baño a 37°C .

El biosensor desarrollado es simple de usar sin requerir un profesional altamente calificado ni el uso de instrumental específico, siendo la reacción de color un procedimiento simple para confirmar la presencia de glucosa.

4.1.6. Bibliografía

- [1] Krishnan, S. (2022). Colorimetric visual sensors for point-of-needs testing. *Sensors and Actuators Reports*, 4, 100078.
- [2] Khizar, S., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Elaissari, A., & Errachid, A. (2022). Prospective analytical role of sensors for environmental screening and monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116751.
- [3] Valcarcel, M. (2000). *Automatización y miniaturización en química analítica*. Springer Science & Business Media.
- [4] Colombo, L., Baruzzi, A. M., & Garay, F. S. (2015). Analysis and optimization of a hydrogel matrix for the development of a sandwich-type glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 211, 125-130.
- [5] Khansili, N., Rattu, G., & Krishna, P. M. (2018). Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, 35-49.
- [6] Mendoza-Madrigal, A. G., Chanona-Perez, J. J., Hernández-Sánchez, H., Palacios-González, E., Calderon-Dominguez, G., Mendez-Mendez, J. V., Blasco, J., & Villa-Vargas, L. A. (2013). Biosensores mecánicos en el área biológica y alimentaria: Una revisión. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(2), 205-225.
- [7] Salimi, A., Sharifi, E., Noorbakhsh, A., & Soltanian, S. (2007). Immobilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: direct electron transfer and electrocatalytic activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 3146-3153.
- [8] Cedillo, L. R., Hernández, C. M. M., Zapata, A. S., Balagurusamy, N., & Escareño, M. P. L. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas Application of Immobilized Enzymes. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11).
- [9] Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in food and nutrition research*, 79, 179-211.
- [10] Otalvaro, J. O., Avena, M., & Brigante, M. (2019). Adsorption of organic pollutants by amine functionalized mesoporous silica in aqueous solution. Effects of pH, ionic strength and some consequences of APTES stability. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103325.
- [11] Gartmann, N., & Brühwiler, D. (2011). Functional group distributions on mesoporous silica. *Chimia*, 65(4), 250-250.
- [12] Limbut, W., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., Limsakul, C., & Wongkittisuksa, B. (2004). Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver® for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(8), 813-821.

- [13] Ozmen, M., Can, K., Akin, I., Arslan, G., Tor, A., Cengeloglu, Y., & Ersoz, M. (2009). Surface modification of glass beads with glutaraldehyde: Characterization and their adsorption property for metal ions. *Journal of hazardous materials*, 171(1-3), 594-600.
- [14] Cardillo, E. (2012). *Fenómenos de transporte de carga en sistemas vítreos formados a partir de óxidos*. (Tesis doctoral)
- [15] Aranberri, I., & Bismarck, A. (2007). Caracterización superficial de minerales arcillosos presentes en los depósitos de crudo. *An. Quim.*, 103(2), 23–27.
- [16] Pelayo Abascal L. (2013). Influencia de la concentración de nanopartículas de sílice en la estabilidad y desestabilidad de suspensiones de sílice micrométrica, Proyecto final de carrera, Universidad de Zaragoza.
- [17] Arroyave, M., Springer, V., & Centurión, M. E. (2020). Novel synthesis without separation and purification processes of carbon dots and silver/carbon hybrid nanoparticles. *Journal of inorganic and organometallic polymers and materials*, 30, 1352-1359.
- [18] Liu, J., Zhang, H., Xiaochuan, X., ul Ahmad, A., Xue, D., Huang, H., Xu, N., Xi, Q., Guo, W., & Liang, H. (2020). High sensitivity detection of glucose with negatively charged gold nanoparticles functionalized the gate of AlGaN/GaN High Electron Mobility Transistor. *Sensors and Actuators A: Physical*, 312, 112128.
- [19] Gong, Y., Xu, J., & Buchanan, R. C. (2018). The aqueous corrosion of nuclear waste glasses revisited: Probing the surface and interfacial phenomena. *Corrosion Science*, 143, 65-75.
- [20] El-Shamy, T. M., & Pantano, C. G. (1977). Decomposition of silicate glasses in alkaline solutions. *Nature*, 266(5604), 704-706.
- [21] Bunker, B. C. (1994). Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 179, 300-308.
- [22] Scholze, H. (1988). Glass-water interactions. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 102(1-3), 1-10.
- [23] Robinet, L., Hall, C., Eremin, K., Fearn, S., & Tate, J. (2009). Alteration of soda silicate glasses by organic pollutants in museums: Mechanisms and kinetics. *Journal of non-crystalline solids*, 355(28-30), 1479-1488.
- [24] González Fá, A. J., Juan, A., & Di Nezio, M. S. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles prepared with honey: the role of carbohydrates. *Analytical Letters*, 50(5), 877-888.

CAPÍTULO

4.2

Desarrollo de un biosensor cronoamperométrico basado en un electrodo comercial de carbono vítreo, modificado con una matriz de hidrogel, para la determinación de compuestos fenólicos en té y yerba mate

4.2.1. Objetivo

El objetivo del trabajo que se describe en este capítulo es diseñar un biosensor cronoamperométrico empleando la enzima tirosinasa (TIR) la cual pertenece a la familia de las polifenol-oxidasas. Para ello se modifica un electrodo de carbono vítreo comercial con la enzima TIR inmovilizada en una matriz de hidrogel compuesta por macromoléculas de quitosano y mucina, empleando como agente entrecruzante glutaraldehído. Se evaluará el desempeño de este biosensor en la determinación de fenoles totales oxidables (FOT) presentes en infusiones tales como té verde, té negro y yerba mate.

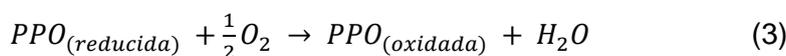
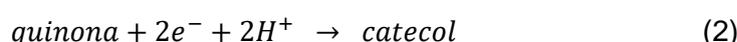
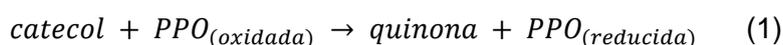
Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Electroquímica en el área de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en colaboración con el profesor Dr. Fernando Garay, en el marco de una pasantía de investigación para jóvenes docentes otorgada por la Universidad Nacional del Sur, llevada a cabo durante el período comprendido entre los meses de febrero y agosto de 2022.

4.2.2. Introducción

Los compuestos fenólicos naturales, que usualmente se encuentran en forma de polifenoles como los flavonoides, están presentes en el reino vegetal y se manifiestan en una amplia variedad de estructuras. Su presencia en los alimentos les confiere no sólo características organolépticas como color y sabor, sino que, además, tienen propiedades que resultan beneficiosas para la salud, motivo por el cual algunos de estos alimentos se utilizan desde hace miles de años con fines terapéuticos [1].

La cuantificación de especies fenólicas es sumamente importante tanto en muestras biológicas, farmacológicas, en tecnología de los alimentos y en estudios de interés ambiental [2-3]. A pesar de que existen varios métodos cromatográficos y espectrofotométricos para la determinación de estos compuestos, todos ellos requieren un laborioso tratamiento de la muestra que no los hace aptos para seguimientos en línea [4-5]. En cambio, las técnicas basadas en métodos electroquímicos presentan varias ventajas tales como: bajo tiempo de detección, volumen de muestra pequeño, alta precisión, simplicidad y elevada especificidad, gracias a la cual se logra minimizar el efecto de especies interferentes, evitando así etapas de pretratamiento que comúnmente requieren mucho tiempo [6]. Los biosensores que emplean enzimas tales como polifenoloxidasas, (lacasa (LAC) y tirosinasa (TIR)), son los más utilizados para

cuantificación de polifenoles en muestras de té [7]. Los sensores enzimáticos presentan grandes ventajas para detectar especies en muestras complejas, ya que las enzimas oxidan selectivamente al analito estudiado sin requerir la purificación de la muestra. Las polifenoloxidasas (PPO) oxidan a especies fenólicas generando quinonas que pueden ser reducidas sin producir especies que afecten el área activa del electrodo de trabajo [8]. Las reacciones que se generan en el biosensor cronoamperométrico en el que se analiza catecol, que es el analito comúnmente empleado para el desarrollo de un biosensor de especies fenólicas, son las siguientes:



Si bien las reacciones (1–3) tienen lugar en el biosensor se llevan a cabo de forma sucesiva dando lugar a un ciclo catalítico [8]. La Figura 4.2.1 muestra un esquema donde se puede observar con mayor detalle dónde transcurren estas reacciones. La reacción (1) tiene lugar cuando el sustrato (S, catecol) difunde hasta la matriz enzimática. En este punto conviene aclarar que la matriz se encuentra contenida entre dos membranas de policarbonato que presentan poros longitudinales (en la dirección del eje x del esquema) de 50 nm. Estas membranas mantienen a los componentes de la matriz enzimática dentro del sándwich, permiten el ingreso de analitos que pueden difundir a través de ella, evitan el ingreso de bacterias que pueden atacar a los componentes de la matriz, y limitan la contribución del movimiento convectivo que se realiza en la solución acuosa. Cuando S alcanza a la enzima, y esta se encuentra en su forma oxidada, esta lo reconoce y lo transforma en una quinona (Q). Sin embargo, después de esta reacción, la enzima queda reducida y para oxidarse puede usar O_2 , que es su mediador natural. La ecuación (3) muestra esta reacción en la que la enzima restablece su forma oxidada y el O_2 se transforma en H_2O . Si bien existen otros mediadores que pueden sustituir al O_2 estos pueden perder su actividad o escapar del biosensor limitando la estabilidad y reproducibilidad del mismo.

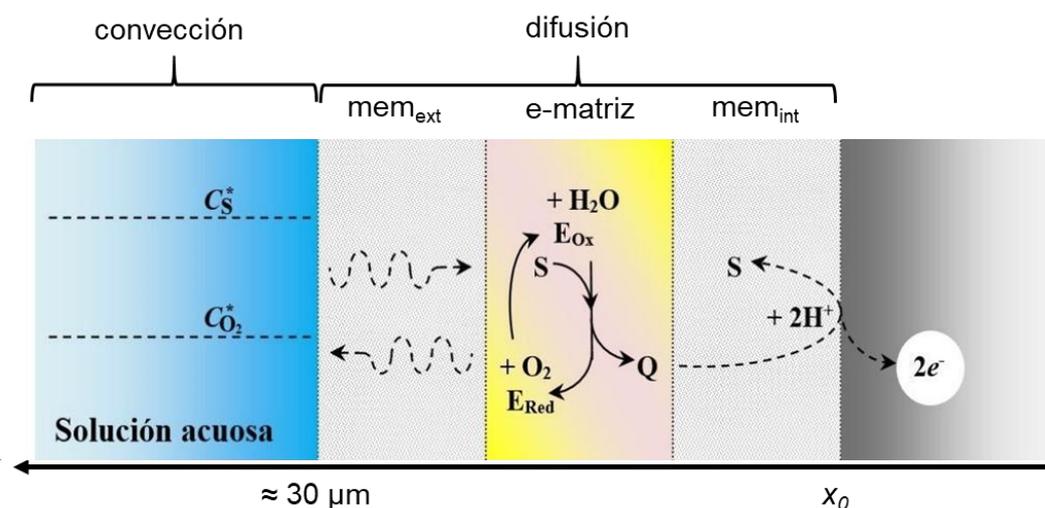


Figura 4.2.1. Esquema transversal de un biosensor tipo sándwich para la detección de sustratos fenólicos.

La enzima genera Q que puede ser reducida sin producir especies que afecten el área activa del biosensor. Esta afirmación corresponde a la ecuación (2) en la que no sólo se logra proteger a la superficie del electrodo de la deposición de polifenoles no conductores, sino que además la reducción de Q transcurre a potenciales muy bajos donde muy pocas especies pueden actuar como interferentes. En la reacción (2) se regenera a S, cerrando el ciclo electrocatalítico. De este modo, es posible entender que la generación de una corriente de reducción, dada por los electrones que ingresan al electrodo de trabajo, está condicionada por presencia de S. Sin embargo, como S se regenera, lo único que se estaría consumiendo es O_2 , por lo que es esta la especie que usualmente determina la máxima concentración de S que puede cuantificarse con un biosensor de esta naturaleza [8].

4.2.3. Materiales y métodos

4.2.3.1. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y se utilizaron sin ninguna purificación previa. Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura desionizada Milli-Q 18,2 M Ω .cm, la cual fue obtenida a través de un sistema Milli-Q de Millipore.

La solución electrolito buffer (SEB) 0,04 M pH 5,0, se preparó disolviendo cloruro de sodio (Anedra, Argentina), fosfato diácido de potasio (Baker J.T, Argentina) y acetato de sodio (Anedra, Argentina) en agua, ajustando el pH mediante el agregado de

soluciones concentradas de NaOH (Merck, Argentina) o HCl (Baker J.T, Argentina). La solución SEB se conservó a 4 °C.

La enzima empleada fue tirosinasa de hongo liofilizada (TIR, Sigma-Aldrich, Argentina) T 3824-25 KU (13,6 unidades enzimáticas (U) por mg). La enzima se disolvió en 0,25 mL de SEB y se prepararon diluciones con SEB con contenidos de enzima de 1000 U de TIR y de 100 U de TIR para preparar biosensores con contenido de enzima de 133 U TIR por sensor y 13 U TIR por sensor respectivamente.

La solución de catecol (1,2 dihidroxi-benceno) se preparó disolviendo catecol (Sigma-Aldrich, Argentina) con agua en un matraz de 10,0 mL de forma tal que la solución tenga una concentración de 0,10 M. Esta solución se conserva a 4 °C. A partir de la solución acuosa comercial de glutaraldehído (GLUT) (25% v/v) (Merck, Alemania), se prepararon diluciones en agua Mili-Q al 1; 2,5; 5; 10% v/v.

Para la preparación del hidrogel, se utilizaron distintos porcentajes de quitosano (Sigma-Aldrich, Argentina) y mucina (Sigma-Aldrich, Argentina) en polvo y se almacenó a 4°C. Se cortaron membranas de policarbonato en forma de discos de 6 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0,05 μm (Whatman Nuclepore, número de catálogo WHA 111103, Sigma, EE. UU.).

4.2.3.2. Instrumentación

Todas las medidas electroquímicas se realizaron con un analizador electroquímico Autolab PGSTAT30. La detección cronoamperométrica se realizó con agitación magnética, Figura 4.2.2a. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un sistema convencional de tres electrodos. Como contraelectrodo (o electrodo auxiliar) se utiliza un alambre de Pt. Todos los potenciales están referidos con respecto al electrodo de referencia empleado Ag|AgCl|KCl (3M) (CH Instruments, EE. UU.). El electrodo de trabajo es de carbono vítreo (ECV) de 3 mm de diámetro (CH Instruments, EE. UU.). Este electrodo es el que se modifica para formar el biosensor con TIR (BST), Figura 4.2.2b.

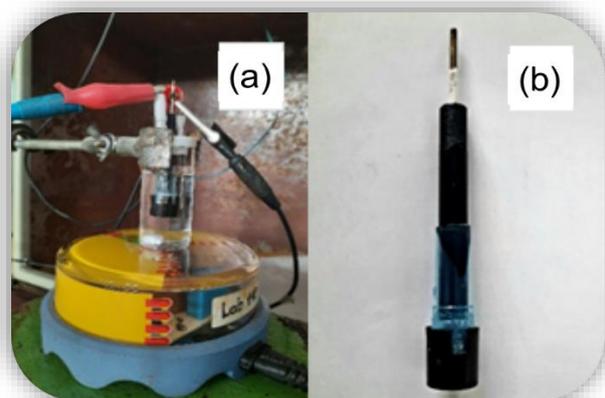


Figura 4.2.2. a) Fotografía de la celda electroquímica utilizada y b) electrodo de trabajo modificado (BST).

4.2.3.3. Preparación de muestras

Las muestras de té verde, té negro y yerba mate, en saquitos, se adquirieron en supermercados de la zona de la ciudad de Córdoba Capital, Argentina.

Para obtener una muestra representativa de 2,0 g de cada muestra se empleó el método de cuarteo, donde cada porción separada es representativa del total [9]. En cada caso, se extrajo el contenido de los saquitos hasta obtener 20 g total de muestra. Posteriormente la muestra completa se coloca sobre una superficie limpia donde se mezcla para homogeneizar con una varilla de vidrio y se la distribuye en forma circular. Luego, se divide en 4 partes iguales, seleccionando dos cuartos opuestos. Las fracciones separadas se mezclan y se repite nuevamente el cuarteo. Esta vez las porciones seleccionadas corresponden a las otras dos diagonales opuestas. Este procedimiento se repite hasta obtener la masa de muestra para el análisis (Figura 4.2.3).

Las infusiones se realizaron pesando 2,0 g de muestra en 200 mL de agua a 100 °C, durante 5 minutos [6] y luego, dejando reposar hasta temperatura ambiente. Todas las infusiones se filtraron y se almacenaron en envases de vidrio oscuros a 4 °C.

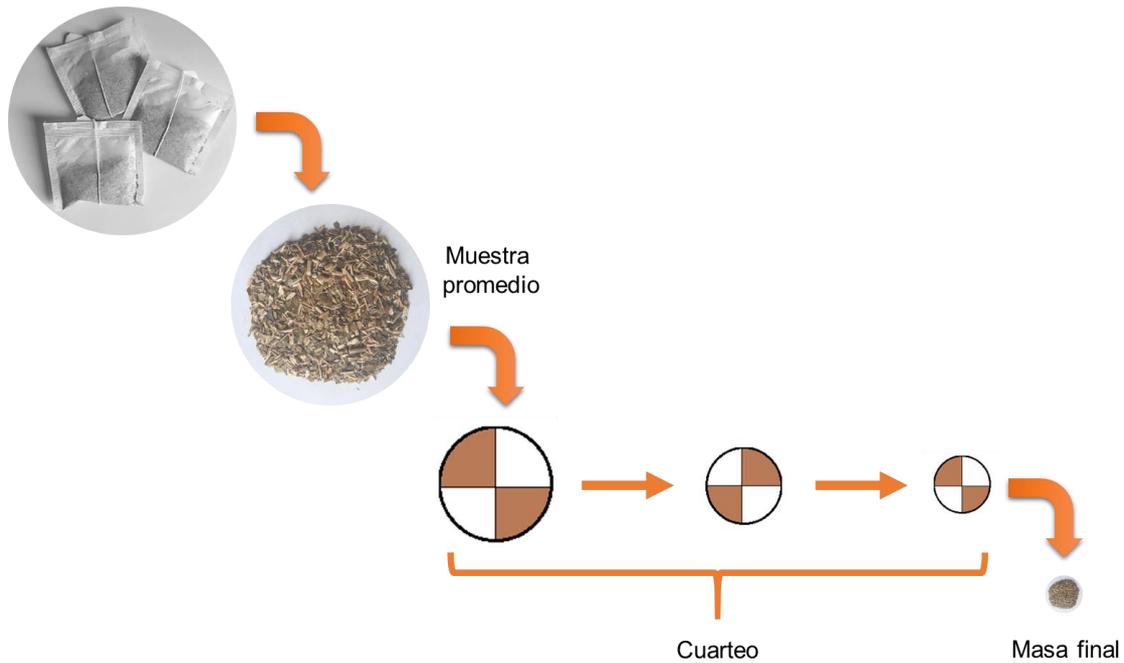


Figura 4.2.3. Procedimiento del método de cuarteo implementado.

4.2.3.4. Preparación de la matriz enzimática

Los biosensores se prepararon utilizando una matriz con los polímeros quitosano y mucina seleccionados a partir de estudios realizados en el grupo de trabajo de Físicoquímica de la Universidad Nacional de Córdoba [8,10-11]. Para preparar la solución de matriz enzimática (Figura 4.2.4), se emplean diferentes proporciones de quitosano y mucina. Para esto se preparan diferentes mezclas pesando distintos porcentajes en masa de quitosano y mucina, que combinadas tienen una masa total de 6,90 mg. Cada mezcla corresponde a un tipo diferente de matriz. Posteriormente, cada una de ellas se disuelve en 80 μL de SEB pH 5,0 y se homogeneiza durante 5 minutos. Luego, se toma una alícuota de 20 μL de esta solución de polímeros y 10 μL de solución de TIR y se agita durante 2 minutos. Experimentalmente se determinó que, si esta solución se conserva a 4 $^{\circ}\text{C}$, la TIR puede mantener su actividad enzimática hasta 96 h. Luego de este tiempo, la sensibilidad de los biosensores comienza a disminuir de una forma no reproducible.

Se preparan sensores que contienen 133 U TIR y 13 U TIR por sensor.

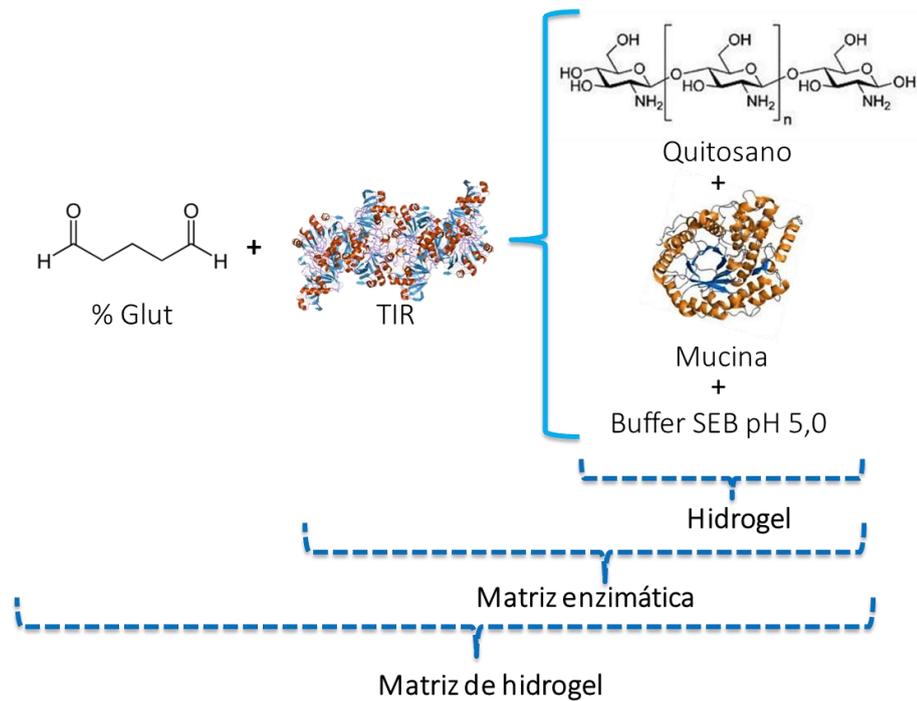


Figura 4.2.4. Preparación de la matriz de hidrogel del biosensor.

4.2.3.5. Construcción del biosensor

La construcción de los biosensores se realiza con un arreglo en forma de sándwich conteniendo a la matriz enzimática, de modo que se pueda sujetar a la superficie del electrodo de carbón vítreo mediante un o-ring de goma y un soporte polimérico, como se esquematiza en las Figuras 4.2.1 y 4.2.5.

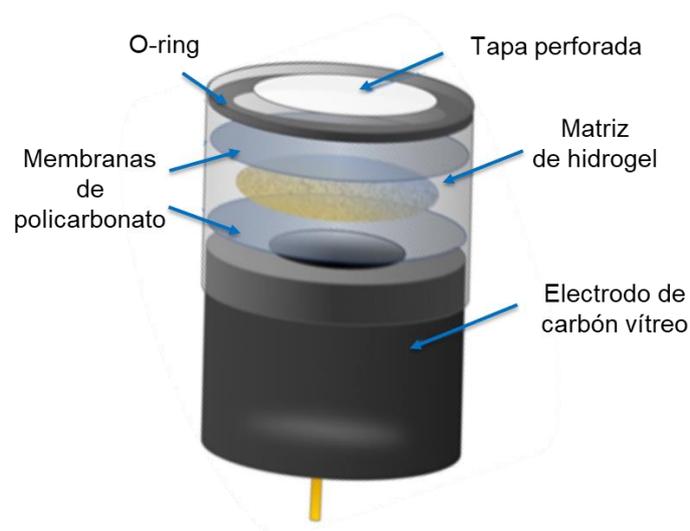


Figura 4.2.5. Esquema del electrodo biosensor.

Para esto, el primer paso consiste en colocar una membrana de policarbonato sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo y agregar 4 μL de una solución de matriz enzimática y 3 μL de una solución de GLUT. Estas soluciones se homogeneizan manualmente en forma cuidadosa por 2 minutos para que el GLUT pueda reaccionar con los componentes de la matriz y formar el hidrogel. Mientras transcurre la reacción de gelificación, la mezcla se cubre con la segunda membrana de policarbonato, se coloca el o-ring y se tapa con el capuchón de plástico, presionando firmemente para lograr un sellado adecuado entre el sándwich y el electrodo de carbono vítreo, Figura 4.2.5. Después de 5 minutos desde el inicio de la reacción de gelificación, el electrodo modificado se sumerge en la solución SEB para remover el GLUT que no haya reaccionado. Luego de esta etapa, el biosensor está listo para ser utilizado.

4.2.3.6. Medidas cronoamperométricas

La celda electroquímica se compone del biosensor, contraelectrodo y electrodo de referencia. Las mediciones electroquímicas se realizan en SEB pH 5,0 a una temperatura de 20 ± 2 °C, agitando a 120 rpm durante todo el experimento electroquímico. Se estabiliza el sistema aplicando un potencial de -0,1 V durante 20 minutos. Las medidas cronoamperométricas se realizan registrando la corriente cada 0,5 segundos, aplicando un potencial de -0,1 V respecto al electrodo de referencia.

4.2.4. Resultados y discusión

4.2.4.1. Estudio electroquímico de catecol

Empleando un electrodo de carbono vítreo sin modificar es posible oxidar directamente especies fenólicas sobre este electrodo. Sin embargo, la oxidación electroquímica de estas moléculas generalmente ocasiona su polimerización sobre el electrodo, formando estructuras no conductoras que impiden su uso sistemático con fines analíticos. Además, la oxidación de fenoles generalmente ocurre a potenciales donde reaccionan otras especies que suelen estar presentes en muestras naturales y que pueden actuar como interferentes. La Figura 4.2.6 a) muestra la respuesta de voltamperometría cíclica (VC) a 200 mVs^{-1} cuando en la celda electroquímica sólo se encuentra la solución SEB. Este perfil voltamperométrico corresponde a la medida del blanco del experimento. Posteriormente, se realiza un agregado de catecol para que la concentración final en la celda electroquímica sea de $10 \mu\text{M}$. Se le realiza el barrido de VC, también a 200 mVs^{-1} . En la Figura 4.2.6 b) se observa el pico de oxidación del

catecol a pH 5,0 cerca de 0,9 V y de reducción alrededor de 0,4 V. La Figura 4.2.6 c) muestra la VC de catecol realizada en días posteriores, empleando el mismo electrodo, a las que se les ha sustraído la señal del blanco.

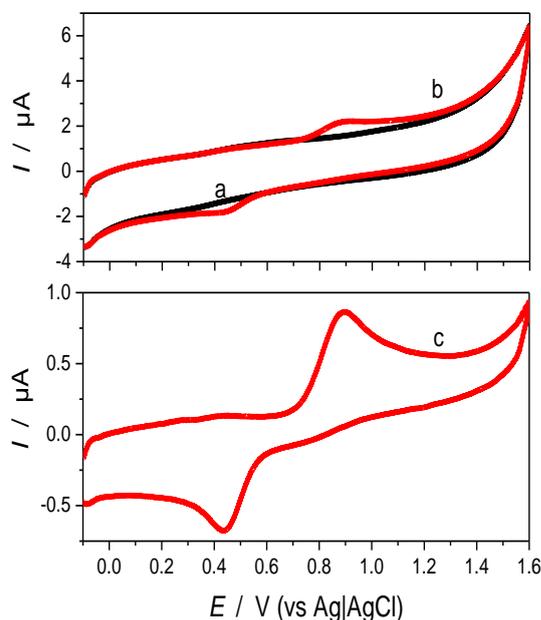


Figura 4.2.6. Registros de VC a 200 mVs^{-1} utilizando un ECV sin modificar. a) SEB pH 5,0; b) $10 \mu\text{M}$ de catecol en SEB y c) $10 \mu\text{M}$ de catecol luego de restar la señal del blanco (buffer SEB pH 5,0).

Por otro lado, cuando se trabaja con un biosensor, la enzima TIR es la responsable de oxidar enzimáticamente al catecol. A partir de experimentos preliminares de voltamperometría cíclica [8,10-11] se demostró que la reducción de las quinonas generadas enzimáticamente se puede medir a $-0,1 \text{ V}$. En consecuencia, se aplica un potencial de acondicionamiento de $-0,1 \text{ V}$ al electrodo de trabajo versus el electrodo de referencia durante 30 minutos antes de cada medición cronoamperométrica. Durante este tiempo, el sistema alcanza el estado estacionario dentro de la matriz enzimática donde se observa un valor de corriente constante y muy bajo. La corriente del paso de potencial de acondicionamiento no se registra. De esta forma aplicando un potencial de $-0,1 \text{ V}$ se produce la reacción de reducción de la quinona. De este modo, la enzima TIR oxida selectivamente a fenoles con capacidad antioxidante y genera quinonas que se pueden reducir electroquímicamente a potenciales bajos donde muy pocas especies de una muestra podrían interferir con la señal analítica, sin afectar la superficie del electrodo, Figuras 4.2.1 y 4.2.7.

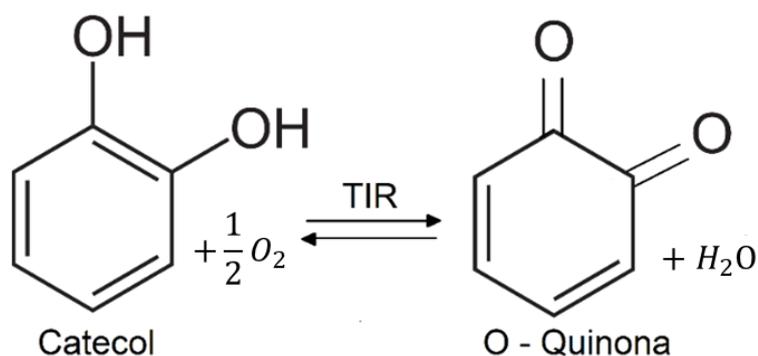


Figura 4.2.7. Reacción de oxidación del catecol catalizada por TIR.

4.2.4.2. Optimización de la matriz enzimática

La optimización del biosensor se realiza a través de un estudio por combinatoria, para evaluar cómo afecta la relación entre cada uno de los componentes que se emplean para desarrollar al hidrogel que contiene a la enzima. Se hicieron curvas de calibrado (corriente límite en función de la concentración de catecol) empleando la técnica de cronoamperometría, con matrices de diferente composición (relación quitosano/mucina y concentración de glutaraldehído), trabajando con una concentración de TIR 133 U/sensor. Las curvas de calibrado de catecol se realizan estudiando matrices con relaciones quitosano/mucina de 10/90, 30/70, 50/50, 70/30 y 90/10. En cada caso se varía la concentración de GLUT (1 %, 2,5 %, 5 %, 10 % y 25 %). De las curvas obtenidas, se obtuvo la sensibilidad (pendiente de la curva de calibrado) y el intervalo lineal. Por otro lado, a partir de los perfiles de cronoamperometría se evaluó el tiempo de respuesta (t_{time}), que corresponde al tiempo en que la corriente alcanza el 95 % del valor de corriente límite (I_{lim}). A modo de ejemplo, en la Figura 4.2.8 se muestra un conjunto de perfiles de cronoamperometría. La Figura 4.2.8 A muestra las respuestas de CA cuando se modifica la relación quitosano/mucina y se trabaja con GLUT al 5 %. En la Figura 4.2.8 B se observan los perfiles cuando se modifica el porcentaje de GLUT, para un grupo de matrices construidas con 50 % de quitosano.

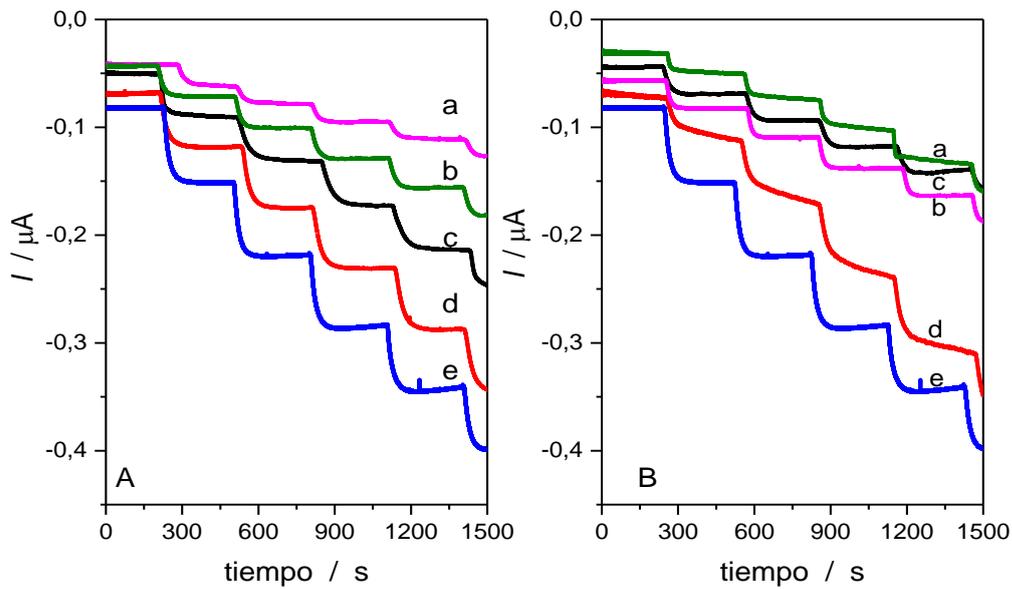


Figura 4.2.8. Perfiles de CA cuando se realizan sucesivas adiciones de $1\mu\text{M}$ catecol usando matrices enzimáticas preparadas con diferentes hidrogel de mucina, quitosano y TIR. Concentración de TIR 133 U/sensor. (A) Concentración de GLUT 5%; de quitosano (a) 10%; (b) 30%; (c) 50%; (d) 70% y (e) 90%; (B) 50%, concentración de GLUT (a) 1%; (b) 2,5%; (c) 5%; (d) 10%; (e) 25%.

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la dependencia de las relaciones quitosano/mucina y las concentraciones de GLUT, con los valores de sensibilidad, intervalo lineal y t_{time} . De esta forma se puede determinar la composición de la matriz enzimática óptima para la construcción del biosensor [11-12]. La Figura 4.2.9 muestra un conjunto de superficies construidas con los datos resultantes.

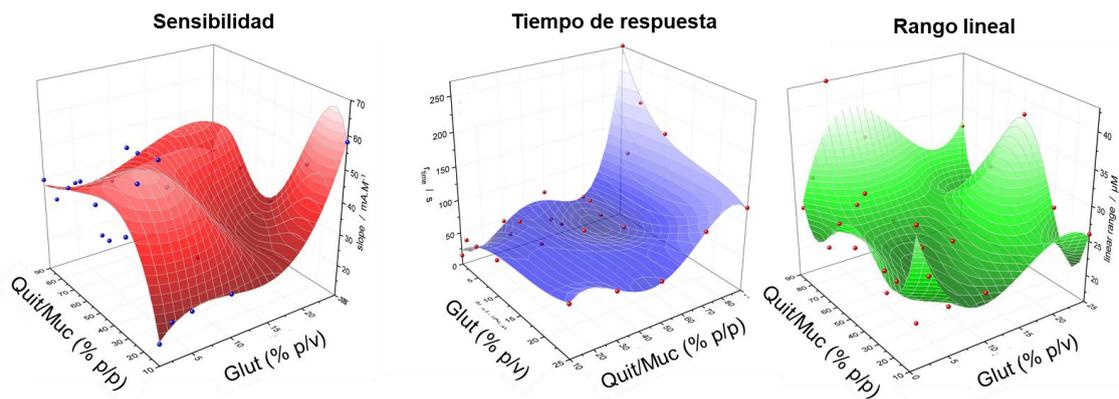


Figura 4.2.9. Dependencia de la sensibilidad, el t_{time} y el rango lineal en función del % de GLUT y de la relación entre las masas de quitosano y mucina empleada en la construcción de matrices enzimáticas preparadas con 133 U/sensor.

Teniendo en cuenta que el entrecruzamiento ocurre principalmente con las moléculas de quitosano, a bajos valores de este polímero una fracción importante de la enzima no es atrapada eficientemente en la matriz. En aquellos casos con elevados porcentajes de quitosano el entrecruzamiento es muy elevado y podría dificultar la difusión del analito en la matriz o bien evitar que la enzima tenga la flexibilidad necesaria para llevar a cabo la reacción de catálisis.

Al estudiar estas superficies se observa en la Figura 4.2.9 que cuando la matriz enzimática se prepara con un 5 % de GLUT y 50 % quitosano presenta un máximo en la sensibilidad. Este comportamiento puede atribuirse al apropiado grado de reticulación debidos a la reacción entre el GLUT y los grupos amino del quitosano, y a la combinación de cargas electrostáticas de la mucina y quitosano. Es importante recordar que la mucina es una glicoproteína que tiene muy pocos grupos amino expuestos a la solución [13-14]. Como consecuencia, las matrices preparadas con baja concentración de GLUT y/o elevada concentración de mucina no se entrecruzan significativamente y la enzima puede escapar de la matriz durante las etapas de lavado previas a la medición. Este resultado muestra la importancia de combinar dos macromoléculas con diferentes características químicas y electrostáticas. En este sentido la TIR estaría favorecida por un ambiente electrostáticamente neutro, proporcionado por las cargas positivas y negativas correspondientes a mucina y quitosano, respectivamente. También podría considerarse que la matriz con 50 % de quitosano proporciona la viscoelasticidad y grado de reticulación más apropiados para el funcionamiento del sensor.

La Figura 4.2.9 muestra que los biosensores construidos con porcentaje de quitosano menor al 70 % presentan respuestas en menor tiempo, que aquellos con mayor cantidad en su composición. Como se indicó anteriormente, un alto nivel de

entrecruzamiento podría limitar la difusión de reactivos y productos a través de la matriz enzimática, aumentando el tiempo de respuesta del sensor [13].

En base a la relación entre sensibilidad y t_{time} , se seleccionó a la matriz enzimática compuesta por 5 % de GLUT y 50 % de quitosano. Esta matriz no sólo presentó la mejor relación entre sensibilidad y t_{time} , sino que también tuvo muy buena reproducibilidad del sensor, respecto a otras composiciones de matriz. Sin embargo, la composición de matriz enzimática seleccionada no presenta un adecuado intervalo lineal entre 0,05 a 6,0 μM . Por ello, se decidió disminuir la concentración de la enzima a 13 U/sensor para incrementar dicho intervalo.

La Figura 4.2.10 muestra buena reproducibilidad en la señal de tres biosensores independientes construidos con la matriz enzimática seleccionada, en los que se emplean sólo 13 U de TIR por sensor. La corriente de inicio de las curvas (a – c) se modificaron con desplazamiento vertical para poder apreciar mejor a cada uno de los perfiles cronoamperométricos. A partir del análisis estadístico de estas respuestas y de otras muy similares en las que se evaluó la reproducibilidad y la repetibilidad de la señal de un mismo sensor se encontró que estos parámetros tuvieron una variación de 4,3 % y 9,0 %, respectivamente.

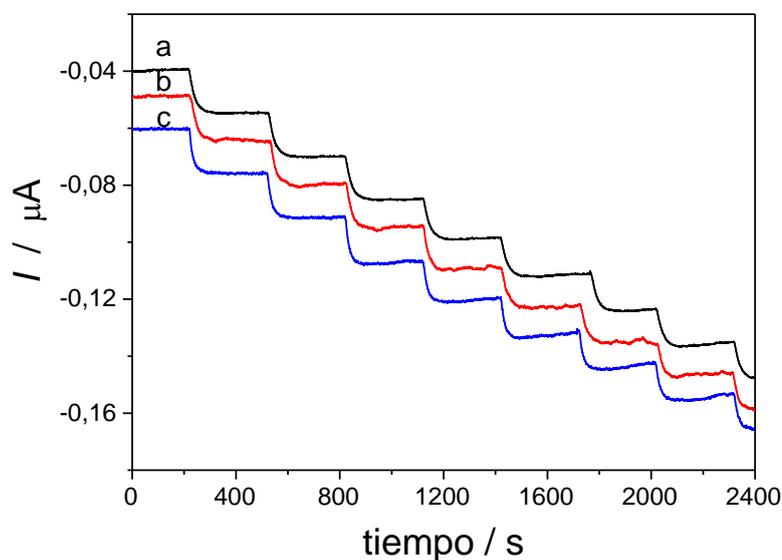


Figura 4.2.10. Perfiles de CA de tres biosensores independientes con desplazamiento vertical preparados con 13 U/sensor, 5% GLUT y quitosano 50%, adiciones sucesivas de catecol 0,05 μM .

4.2.4.3. Verificación del efecto de la enzima

La Figura 4.2.11 muestra la respuesta de CA de dos matrices preparadas con 5% GLUT y quitosano 50%, pero en la curva (a) no se incorpora TIR, mientras que en la curva (b) se agregan 13 U de TIR a la matriz. Las flechas indican el momento en que se realizan agregados de 2 μM de catecol cada 300 s en SEB pH 5,0. En la curva (a) se puede observar que la corriente se mantiene constante y sin cambios frente a los agregados de catecol. Por el contrario, la curva (b) muestra los sucesivos aumentos en el valor absoluto de la corriente debido a la reacción de catálisis enzimática que efectúa la TIR atrapada en la matriz.

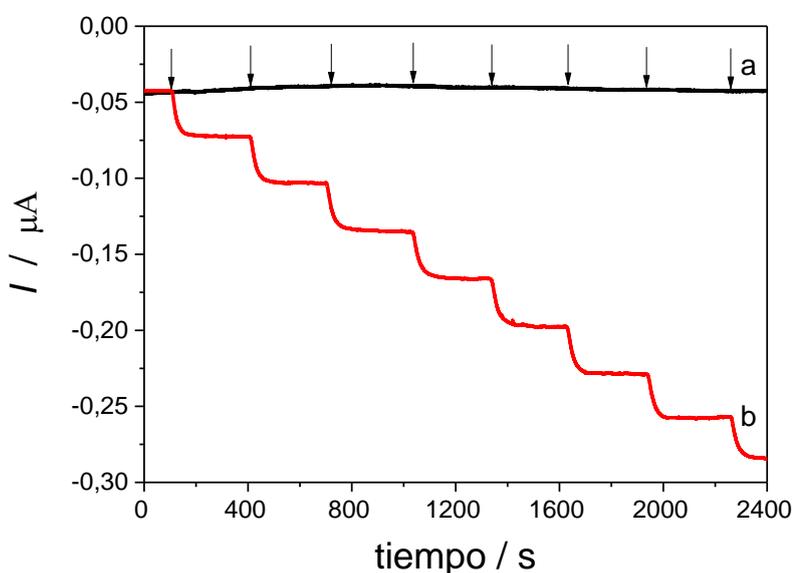


Figura 4.2.11. Perfiles de CA de: (a) una matriz sin enzima y (b) un biosensor preparado con 13 U de TIR. En ambos casos se trabajó con 5% GLUT, quitosano 50% y adiciones sucesivas de catecol 2 μM .

4.2.4.4. Determinación de los parámetros analíticos para el biosensor optimizado

La Figura 4.2.12 muestra la respuesta de CA correspondiente a un biosensor preparado con la matriz enzimática con 5 % GLUT, quitosano 50 % y 13 U de TIR en un intervalo de concentraciones entre 0,05 a 70 μM s de catecol, observándose la pérdida de linealidad de la respuesta del biosensor a concentraciones mayores de 20 μM CAT. Por lo tanto, la zona lineal de la curva I vs C corresponde al intervalo 0,05 - 20 μM CAT.

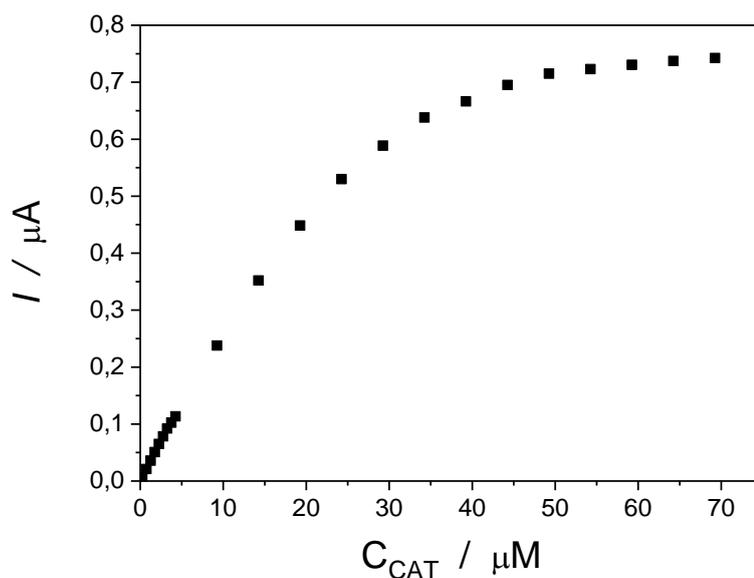


Figura 4.2.12. Intervalo de concentraciones de catecol estudiado.

La Figura 4.2.13 muestra el perfil cronoamperométrico correspondiente a las concentraciones de catecol estudiadas. La curva de calibrado (Figura 4.2.14) fue construida a partir de los valores de corriente límite en función de la concentración de catecol. La ecuación de la curva de calibrado obtenida fue $I = (4,04 \times 10^{-3} \pm 0,40 \times 10^{-3}) + (24,23 \times 10^{-3} \pm 0,07 \times 10^{-3}) \cdot C_{\text{CAT}}$, donde I representa la corriente límite en unidades de μA y C_{CAT} la concentración de catecol en unidades de μM . A partir del análisis de regresión lineal de la curva de calibrado se obtuvo un valor de coeficiente de correlación $R^2 = 0,999$. Además, se determinaron los valores de límite de detección ($\text{LOD} = 0,049 \mu\text{M}$) y el límite de cuantificación ($\text{LOQ} = 0,165 \mu\text{M}$), correspondientes a 3 y 10 veces (respectivamente) el valor de la desviación estándar de la ordenada al origen dividido por la pendiente de la recta [15].

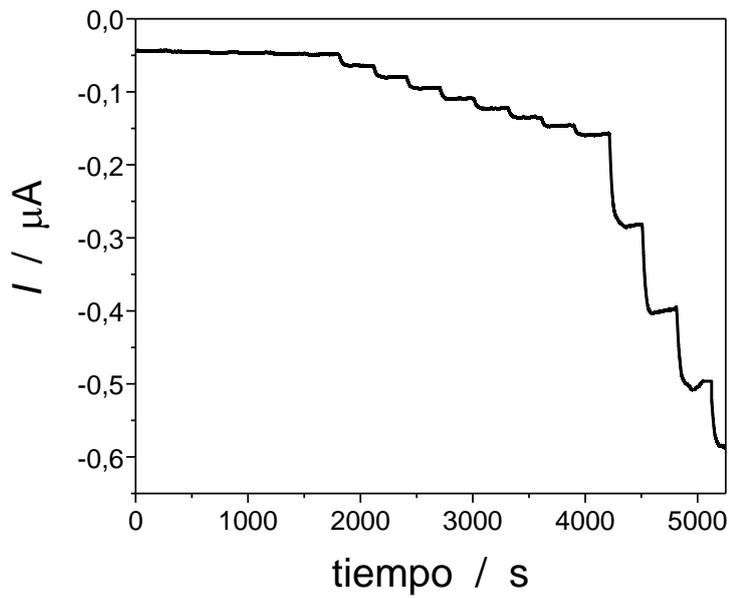


Figura 4.2.13. Perfil de CA de un biosensor preparado con 13 U de TIR, 5% GLUT y quitosano 50% a diferentes concentraciones de catecol.

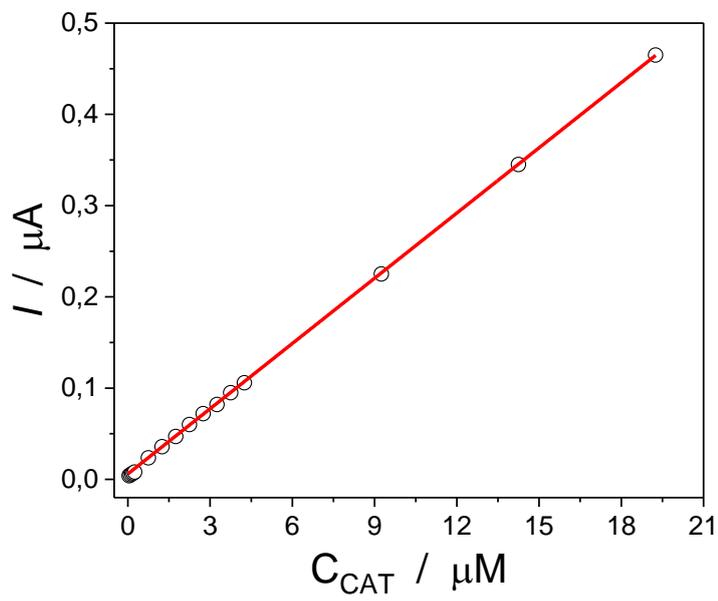


Figura 4.2.14. Curva de calibrado construida a partir de los valores de corriente límite del perfil I/t .

Analizando los datos de la Figura 4.2.13 se puede observar que el BST muestra un tiempo de respuesta menor a 1 minuto para concentraciones de catecol que varían en tres órdenes de magnitud, desde $5,0 \times 10^{-2}$ hasta $2,0 \times 10^1 \mu\text{M}$. El tiempo de vida del biosensor fue de 10 días (15 usos) almacenado en SEB 0,4 M pH 5 a 4°C.

En la Tabla 4.2.1 puede observarse que el LOD obtenido resulta menor con respecto a otros métodos electroquímicos encontrados en la literatura donde fueron determinados las especies fenólicas ácido gálico [16] y catecol [17-18]. La ventaja principal de este sensor es el número de veces que puede reutilizarse comparado a los demás biosensores.

Tabla 4.2.1. Comparación del biosensor desarrollado respecto a otros de bibliografía.

Electrodo	Analito	Inter. lineal [μM]	LOD [μM]	N° uso	Método	Elect.	Muestra	Ref
Grafito/ePDA-LAC	ác. gálico	1-150	0,29	1	Amp	CPB pH 4,6	cáscara castaña	[16]
PC/BSA/LAC	CAT	20-700	4,60	-	VPD	0,1 M buffer fosfato pH 7	agua residual	[17]
TIR-ND-PS/GCE	CAT	5-740	0,39	-	VPD	0,2 M buffer fosfato pH 6	agua de río y grifo	[18]
LAC-rGO/TiS ₂ /NAF/SPE	epiCAT	0,1-250	0,07	1	Amp	50 mM buffer ABS pH 5,0	vino tinto y jugo de fruta	[19]
GCE/Quit/Muc/TIR	CAT	0,05-20	0,049	15	Amp	buffer SEB pH 5,0	té verde y negro, yerba mate	este trabajo

*Amp=amperometría, PC= pasta de carbono, LAC=Lacasa, CAT= catecol, rGO= óxido de grafeno, TiS₂= disulfuro de titanio, NAF= Nafión, SPE= electrodo serigrafado, epiCAT= epicatequina, VPD=voltamperometría de pulso diferencial, GCE=carbón vítreo. Elect=electrolito.

4.2.4.5. Análisis de FOT en muestras reales

El biosensor optimizado se utilizó para determinar la concentración de FOT en muestras de infusiones de yerba mate (YM), té verde (TV) y té negro (TN). Las medidas se realizaron mediante la técnica de adición estándar ya que las muestras analizadas tienen varios componentes que pueden generar un efecto matriz. A continuación, se

presentan la Figura 4.2.14 y la Tabla 4.2.2 que muestran los resultados obtenidos para este estudio.

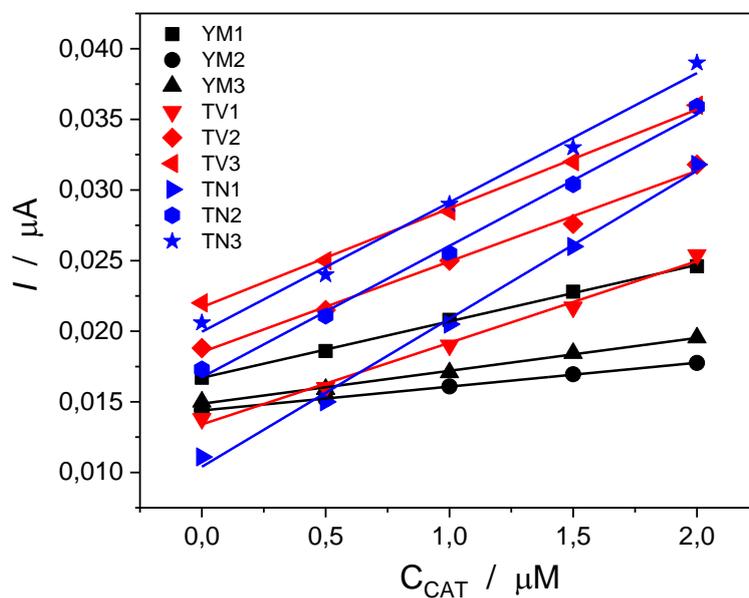


Figura 4.2.14. Curvas de adición estándar con las muestras estudiadas.

Tabla 4.2.2. Determinación de FOT en infusiones con un biosensor de TIR.

Muestras	N°	FOT [μM CAT]	Equiv. de CAT por L muestra [mgL^{-1}]
<i>Yerba mate</i>	YM1	1670 ± 27	184 ± 3
	YM2	1702 ± 11	187 ± 1
	YM3	1278 ± 24	141 ± 3
<i>Té verde</i>	TV4	924 ± 20	102 ± 2
	TV5	1156 ± 16	127 ± 2
	TV6	1240 ± 16	136 ± 2
<i>Té negro</i>	TN7	396 ± 11	44 ± 1
	TN8	360 ± 12	40 ± 1
	TN9	434 ± 12	48 ± 1

Para cada una de las muestras analizadas se obtuvieron las curvas por adición estándar. Para la YM la pendiente varía entre 0,002 y 0,004 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$, para TV 0,006 y 0,007 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ y TN entre 0,009 y 0,010 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$. Estas pendientes son significativamente menores comparadas con la pendiente de la curva de calibrado empleando catecol (ítem 4.2.4.4, Figura 4.2.13) lo que demuestra la presencia de efecto matriz.

Los resultados que se informan en la Tabla 4.2.2 corresponden a valores promediados a partir de los análisis realizados por triplicado, los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Los principales compuestos polifenólicos presentes en el té verde también están presentes en el té negro, pero en diferentes cantidades, lo que probablemente esté relacionado con la mayoría de las catequinas que se oxidan y polimerizan mediante enzimas derivadas de las hojas de té durante el proceso de fermentación (proceso de oxidación mayor en té negro) observando en la Tabla 4.2.2 que los FOT en té negro son notablemente menores que en el té verde [20-21]. Estos resultados sugieren que la conversión de catequinas durante el procesamiento del té negro afectó la potencia de los radicales libres del té [22].

Respecto al contenido de fenoles totales en yerba mate se observan valores más altos respecto al contenido de fenoles en té verde y té negro, comparable con la información reportada por Bracesco y col., donde indican los niveles de polifenoles de los extractos de *Ilex paraguariensis* son más altos que los del té verde y similares a las de los vinos tintos [23].

La concentración de los FOT también se informa como la masa de equivalentes de catecol por litro de infusión para simplificar la comparación con otras referencias de biosensores [6, 24]. Para Barroso y col., el contenido de fenoles totales expresado en concentración de catecol en diferentes infusiones de tés se encuentra entre 37 a 463 mg L^{-1} en cambio, para Fernandes y col., el contenido de fenoles totales expresado en equivalentes de catequina en té verde se encuentran entre 80 a 160 mg L^{-1} . Los valores de FOT obtenidos fueron consistentes con el rango de concentración en tés comparando con los resultados del biosensor de polifenoles totales en té verde estudiado por Hidayat y col., con un contenido de FOT expresado en equivalentes de catequina entre 109 a 202 mg L^{-1} [25].

4.2.5. Conclusiones parciales

Se desarrolló un biosensor cronoamperométrico para la detección de fenoles oxidables totales expresados en equivalentes de catecol por litro de infusión. Para esto se estudiaron diferentes factores que afectan en la construcción de biosensores tipo sándwich, particularmente cuando se emplea a la enzima TIR como elemento biocatalítico en la matriz enzimática. En este sentido, se logró optimizar la respuesta del biosensor, que permitió evaluar cómo afecta la relación entre los componentes quitosano y mucina que se emplearon en la construcción del hidrogel que contiene a la enzima tirosinasa. Esta evaluación permitió determinar la relación quitosano/mucina y el grado de entrecruzamiento más apropiado para maximizar parámetros vinculados a la sensibilidad, el intervalo de linealidad y el tiempo de respuesta.

A partir del estudio comparativo entre las respuestas del biosensor optimizado con respecto a otros encontrados en bibliografía, se puede destacar que el biosensor desarrollado es de relativo bajo costo, simple, de rápida respuesta, bajo consumo de reactivos, y altamente reproducible. Además, el biosensor puede emplearse al menos 15 veces.

El biosensor desarrollado se aplicó para cuantificar el contenido de FOT en infusiones de té verde, té negro y yerba mate, resultando un método sencillo y rápido para este tipo de análisis.

4.2.6. Bibliografía

- [1] Chiorcea-Paquim, A. M., Enache, T. A., De Souza Gil, E., & Oliveira-Brett, A. M. (2020). Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1680-1726.
- [2] Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Hanaoka, T. A., Mizukami, F., & Ono, M. (2011). Amperometric detection of phenolic compounds with enzyme immobilized in mesoporous silica prepared by electrophoretic deposition. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153(2), 361-368.
- [3] Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and microbial technology*, 48(3), 195-208.
- [4] Wang, J., Lu, J., Ly, S. Y., Vuki, M., Tian, B., Adeniyi, W. K., & Armendariz, R. A. (2000). Lab-on-a-cable for electrochemical monitoring of phenolic contaminants. *Analytical chemistry*, 72(11), 2659-2663.
- [5] Pissinis, D. E., & Marioli, J. M. (2007). Electrochemical Detection of 2, 6-Diisopropylphenol (Propofol) in Reversed Phase HPLC at High pH. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 30(12), 1787-1795.
- [6] Barroso, M. F., Ramalhosa, M. J., Alves, R. C., Dias, A., Soares, C. M., Oliva-Teles, M. T., & Delerue-Matos, C. (2016). Total antioxidant capacity of plant infusions: Assessment using electrochemical DNA-based biosensor and spectrophotometric methods. *Food Control*, 68, 153-161.
- [7] Martin, C. S., & Alessio, P. (2020). Analysis of polyphenolic content in teas using sensors. In *Safety Issues in Beverage Production* (pp. 359-397). Academic Press.
- [8] Garay, F. (2015). How low does the oxygen concentration go within a sandwich-type amperometric biosensor? Part 2: Theory for PPO biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 581-587.
- [9] World Health Organization. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization.
- [10] Colombo, L., & Garay, F. (2018). A robust and practically free of charge intermittent use glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256, 751-759.
- [11] Colombo, L. (2018). Tesis Doctoral: Estudio de propiedades fisicoquímicas de matrices de hidrogel y de su interacción con biomoléculas para el desarrollo de biosensores. Director: Garay F., Fac. Cs. Qs., Universidad Nacional Córdoba, Córdoba.

- [12] Romero, M. R., Garay, F., & Baruzzi, A. M. (2008). Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131(2), 590-595.
- [13] Alemán Nava, G. S., Rodríguez Delgado, J. M., Parra Saldivar, R., Martínez Chapa, S. O., & Dieck Assad, G. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds.
- [14] Bisswanger, H. (2017). *Enzyme kinetics: principles and methods*. John Wiley & Sons.
- [15] Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica* (No. 543.062: 519.23 MIL).
- [16] Almeida, L. C., Correia, R. D., Squillaci, G., Morana, A., La Cara, F., Correia, J. P., & Viana, A. S. (2019). Electrochemical deposition of bio-inspired laccase-polydopamine films for phenolic sensors. *Electrochimica Acta*, 319, 462-471.
- [17] Gil, E. S., Muller, L., Santiago, M. F., & Garcia, T. A. (2009). Biosensor based on brut extract from laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for environmental analysis of phenolic compounds. *J Portuguese Electrochem Society*, 27, 215-225.
- [18] Camargo, J. R., Baccarin, M., Raymundo-Pereira, P. A., Campos, A. M., Oliveira, G. G., Fatibello-Filho, O., Oliveira Jr., O. N., & Janegitz, B. C. (2018). Electrochemical biosensor made with tyrosinase immobilized in a matrix of nanodiamonds and potato starch for detecting phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 1034, 137-143.
- [19] Evli, S., & Uygun, D. A. (2023). Laccase modified GO/TiS₂ nanocomposite based amperometric biosensor for (-)-epicatechin detection. *Microchemical Journal*, 188, 108501.
- [20] Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food research international*, 50(2), 469-479.
- [21] Martin, C. S., & Alessio, P. (2020). Analysis of polyphenolic content in teas using sensors. In *Safety Issues in Beverage Production* (pp. 359-397). Academic Press.
- [22] Karori, S. M., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., & Ngure, R. M. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. *African journal of Biotechnology*, 6(19)
- [23] Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of ethnopharmacology*, 136(3), 378-384.
- [24] Fernandes, S. C., Osório, R. E. H. M., Anjos, A. D., Neves, A., Micke, G. A., & Vieira, I. C. (2008). Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 1215-1223.

[25] Hidayat, M. A., Maharani, D. A., Purwanto, D. A., Kuswandi, B., & Yuwono, M. (2020). Simple and sensitive paper-based colorimetric biosensor for determining total polyphenol content of the green tea beverages. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 25, 255-263.

CAPÍTULO

5

CONCLUSIONES GENERALES

5. Conclusiones generales

En esta Tesis, se han desarrollado materiales innovadores empleando diferentes estrategias para su modificación. Se destacan sistemas basados en:

- Una matriz vítrea de boro modificado con nanopartículas de carbono
- Una matriz vítrea de óxidos de molibdeno, sodio y boro
- Micropartículas vítreas de silicato comercial modificadas con urea para anclar la enzima glucosa oxidasa
- Carbono vítreo modificado con una matriz de hidrogel (quitosano/mucina) en presencia de tirosinasa

Estos materiales innovadores se emplearon para diseñar sensores químicos empleando las técnicas de voltamperometría de onda cuadrada para la determinación de hierro en muestras de leche en polvo fortificadas y espectrometría UV-Vis para la determinación rápida de azúcares reductores en muestras de miel. Asimismo, se desarrollaron biosensores para detección visual de glucosa en miel y para la determinación de fenoles oxidables totales en té verde, té negro y en yerba mate, utilizando cronoamperometría.

En todos los casos se logró optimizar las variables empíricas a través de diseños experimentales.

Los sensores ofrecen varias ventajas en comparación con otras técnicas analíticas, como un bajo consumo de reactivos que, además, son de baja toxicidad. También destacan por su bajo costo de instrumental, su facilidad de fabricación y uso, lo que significa que no necesitan personal altamente calificado y además, estos sensores, proporcionan respuestas rápidas.

Los sensores desarrollados en esta Tesis Doctoral en Química contribuyen a evaluar la calidad de los productos agropecuarios, favoreciendo al desarrollo del sector productivo de nuestro país.



APÉNDICE

A.1. PRODUCTIVIDAD

Durante el periodo comprendido en esta Tesis, se obtuvo la siguiente productividad.

A.1.1. Publicaciones en revistas científicas

- ❖ **MARIANELA ZORATTI**, MARÍA EUGENIA CENTURIÓN, MARISA ALEJANDRA FRECHERO. Green inorganic material designed for an easy and cost-effective method of the reducing-sugars determination. (Enviado 2024).
- ❖ **MARIANELA ZORATTI**, MARISA ALEJANDRA FRECHERO, MARÍA EUGENIA CENTURIÓN. Voltammetric Sensor Based on Molybdenum-Vanadium-Lithium-Borate Glassy Matrix and Its Application for the Determination of Iron in Fortified Milk Powder. *Journal of Analytical Chemistry*; Springer; Año: 2023 vol. 79 p. 820-829. DOI: 10.1134/S1061934824700205
- ❖ **ZORATTI, MARIANELA.**; CENTURIÓN, MARÍA E.; FRECHERO, MARISA A. An innovative method for anchoring glucose-sensing molecules on glassy microparticles. *Material Science & Engineering International Journal*; Medcrave; Año: 2020 vol. 4 p. 139-142. DOI: 10.15406/mseij.2020.04.00140
- ❖ LUIS A HERNANDEZ GARCIA; MAGALI C MOLINA; **MARIANELA ZORATTI**; EVANGELINA CARDILLO; SOLEDAD TERNY; MARIELA SOLA; MARISA A FRECHERO. Ion-polaron interaction in modified tellurite glasses. *Material Science & Engineering International Journal*; Medcrave; Año: 2019 vol. 3 p. 113 – 116. DOI: 10.15406/mseij.2019.03.00100

A.1.2. Presentaciones en congresos y reuniones científicas

- ❖ **ZORATTI, MARIANELA.**; CENTURIÓN MARÍA E.; FRECHERO, MARISA A. Determinación rápida de azúcares por reacción del azul de molibdeno en un sustrato vítreo. XXIII Congreso de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Lugar: El Calafate, Santa Cruz; Año: 2023.

- ❖ **ZORATTI MARIANELA;** GARAY FERNANDO S. Biosensor amperométrico para determinación de compuestos fenólicos en infusiones. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos – CICYTAC, Lugar: Córdoba, Año: 2022.

- ❖ **ZORATTI MARIANELA;** GARAY FERNANDO S. Optimización de matrices de hidrogel para la construcción de biosensores basados en la enzima Lacasa. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos – CICYTAC, Lugar: Córdoba, Año: 2022.

- ❖ **ZORATTI MARIANELA;** FRECHERO MARISA A; CENTURIÓN MARÍA E. Síntesis verde de Cdots: estudio de la concentración del precursor para su aplicación en sensores electroanalíticos. XXI Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados (NANO 2022). Lugar: Río Cuarto, Córdoba, Año: 2022.

- ❖ **MARIANELA ZORATTI;** MARISA A FRECHERO; MARÍA E CENTURIÓN. Sensor electroquímico para la determinación de hierro en muestras de leche en polvo fortificada. XI Congreso Argentino de Química Analítica. Lugar: Corrientes; Año: 2021.

- ❖ **ZORATTI, MARIANELA.;** CARDILLO, EVANGELINA.;; CENTURIÓN, MARÍA E.;; FRECHERO, MARISA A. Sustrato vítreo modificado como sensor de glucosa. X CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA ANALÍTICA. Lugar: La Pampa; Año: 2019.

- ❖ **ZORATTI, MARIANELA.;** KREPPER, GABRIELA; CARDILLO, EVANGELINA.;; CENTURIÓN, MARÍA E.;; FRECHERO, MARISA A.;; CENTURIÓN, MARÍA E. Sistemas vítreos conductores para el desarrollo de nuevos sensores electroanalíticos. X CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA ANALÍTICA. Lugar: La Pampa; Año: 2019.

- ❖ CARDILLO, EVANGELINA.;; **ZORATTI, MARIANELA.;** FRECHERO, MARISA A. Efecto de cationes móviles en vidrios de borato para retener Mo

de desechos nucleares. XXI Congreso de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Lugar: Tucumán; Año: 2019.

A.2. BECAS OBTENIDAS

❖ BECA DOCTORAL DE UNIDAD EJECUTORA CONICET.

Tema: "BIOVIDRIOS MODIFICADOS PARA APLICACIONES ANALÍTICAS EN ALIMENTOS DE ORIGEN AGROPECUARIO". Desde el 1 de abril 2018 hasta el 31 de marzo de 2024: Dras. Marisa A. Frechero y María E. Centurión.

❖ Estancia de investigación en el Laboratorio de Electroquímica, INFIQC-CONICET, Depto de Físicoquímica de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Programa de financiamiento parcial para jóvenes docentes UNS para realizar estancias breves en centros de investigación. Título del proyecto: "ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE MATRICES DE HIDROGEL Y DE SU INTERACCIÓN CON NANOMATERIALES PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES". Director: Dr. Fernando S. Garay. Duración: 13 de febrero de 2022 hasta el 6 de agosto de 2022.