



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR NANOESTRUCTURADO (TiO₂) PRODUCIDO POR SOL-GEL PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

Que como requisito para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. María Esther Tadeo González

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo

Morelia, Michoacán, Agosto del 2013

“Mientras exista un mañana para volver a empezar...entonces todo es posible”
(Michelle Labbé)

“Convierte a las malas experiencias en oportunidades para aprender”

Dedicatoria

*Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño:
A mis Padres: Isaías y Ma. Esther,
Y a mis Hermanos: Beraquiel, Silvia, Carlos y Margarita.*

Por todo su apoyo incondicional en este pequeño pero significativo logro.

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Químico Farmacobiología por el apoyo y la formación educativa que me brindaron durante mi estancia en este programa.

Al Laboratorio de Investigación en Biotecnología de la Facultad Químico Farmacobiología de la UMSNH, dónde realicé gran parte de investigación del proyecto.

Al Laboratorio de Materiales Avanzados de la Universidad Veracruzana y al Dr. Leandro García González por haberme aceptado para realizar mi estancia de movilidad nacional del Programa Conacyt.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante los estudios de maestría, con numero de Becario **253805**.

A PROMEP a través de la convocatoria Evaluación de Proyectos de Redes Temáticas de Colaboración Convocatoria 2011 a la red “MATERIALES NANOESTRUCTURADOS” al proyecto titulado *Investigación y Desarrollo de Conductores Transparentes* mediante el oficio **PROMEP/103.5/12/2181** por el soporte económico al trabajo de investigación

Agradecimientos

A Dios por haberme dado la oportunidad de estar aquí, por permitirme terminar mi maestría y darme todo lo que tengo.

A mis Padres Isaías Tadeo Cacho y María Esther González Ochoa, por su apoyo en todas las etapas de mi formación, darme fuerzas de motivación, darle sentido a mi vida y por ser un ejemplo de lucha a seguir, los quiero y que Dios los bendiga hoy y siempre.

A mis hermanos: Beraquiel, Silvia, Carlos y Margarita, por todo su cariño, comprensión, motivación, apoyo incondicional en todo momento y ser la familia que somos.

A mis sobrinas, Alicia Scarlett y Ximena y al pequeño Fabián por regalarnos siempre una sonrisa y traer alegría a la familia.

A mi asesora de Tesis, la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, por todo el apoyo brindado durante mis estudios de maestría, por sus consejos, tiempo, dedicación y paciencia.

A los revisores de mi tesis: El Dr. Héctor E. Martínez Flores, Dra. Sandra Leticia Bribiesca, Dra. Maricela Villicaña Méndez y al Dr. Leandro García González, por todo su tiempo y aportaciones realizadas para mejorar la tesis.

En especial al Dr. Héctor E. Martínez Flores y la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo por sus consejos, confianza y apoyo incondicional, antes y durante mis estudios de maestría.

A las personas que caminaron conmigo esta etapa tan importante; a mis compañeros y amigas de maestría en especial a Sarahí, Tsanda, Nora y Erika, por brindarme su amistad, compartir conmigo sus conocimientos y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis amigas de toda la vida, Pau, Kary y Elvira... por el cariño, la confianza y por estar siempre en los momentos que más las necesito, Gracias chicas.

A todas las personas y amigos que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis.....Mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
ESTRUCTURA DE LA TESIS	12
INTRODUCCIÓN	13
1 ESTADO DEL ARTE DE LOS BIOSENSORES	15
1.1 BIOSENSORES	15
1.1.1 <i>Clasificación</i>	16
1.1.2 <i>Naturaleza de material biológico</i>	16
1.1.3 <i>Sistema de Transducción</i>	17
1.1.4 <i>Electrodos o base del Transductor</i>	19
1.1.5 <i>Sistemas de inmovilización</i>	19
1.2 PROCESO SOL-GEL	22
1.2.1 <i>Precursores empleados en el proceso sol-gel</i>	24
1.2.2 <i>Reacciones en el proceso sol-gel</i>	24
1.2.3 <i>Gelación</i>	26
1.2.4 <i>Envejecimiento</i>	26
1.2.5 <i>Secado</i>	26
1.2.6 <i>Materiales obtenidos por el proceso Sol-gel</i>	27
1.2.7 <i>Ventajas y desventajas del proceso sol-gel</i>	28
1.3 GENERALIDADES DEL DIÓXIDO DE TITANIO.....	29
1.3.1 <i>Aplicaciones de TiO₂</i>	32
1.3.2 <i>Métodos de Obtención</i>	33

1.4	PELÍCULAS POR TÉCNICA SOL-GEL.....	35
1.5	PARTÍCULAS NANOMÉTRICAS EN UN MATRIZ POLIMÉRICA	36
1.6	ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO BIOLÓGICO	37
1.7	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	39
1.7.1	<i>Difracción de Rayos X</i>	39
1.7.2	<i>Espectroscopía de Infrarrojo</i>	44
1.7.3	<i>Espectroscopía de Raman</i>	46
1.7.4	<i>Microscopia Electrónica de Barrido</i>	48
1.7.5	<i>Microscopia Electrónica de Transmisión</i>	49
1.7.6	<i>Espectroscopía de Impedancia Electroquímica</i>	50
1.7.7	<i>Presentación de los Datos de Impedancia</i>	52
2	JUSTIFICACIÓN.....	55
3	HIPÓTESIS.....	56
4	OBJETIVOS.....	57
4.1	GENERAL.....	57
4.2	ESPECÍFICOS.....	57
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
5.1	REACTIVOS.....	58
5.2	EQUIPO.....	58
5.3	SÍNTESIS DE TiO ₂	60
5.4	FORMACIÓN DE PELÍCULAS EN LA BASE DE LOS ELECTRODOS DE GRAFITO.....	61
5.4.1	<i>Tratamiento de Pulido</i>	61
5.4.2	<i>Recubrimiento TiO₂-PVA en electrodos de grafito</i>	61
5.4.3	<i>Caracterización por Impedancia Electroquímica</i>	62
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1	ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y MORFOLÓGICO DEL GRAFITO	63
6.2	CARACTERIZACIÓN DE TiO ₂	64
6.2.1	<i>Polvos de TiO₂-PVA</i>	68
6.2.2	<i>Caracterización de los recubrimientos TiO₂-PVA</i>	73
6.3	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS).....	78

6.3.1	<i>Circuito Eléctrico Equivalente (CEE)</i>	83
7	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	86
7.1	CONCLUSIONES	86
7.2	PERSPECTIVAS	87
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO 1	93

Índice de figuras

FIGURA 1. ESQUEMA GENERAL DE UN BIOSENSOR.....	15
FIGURA 2. PRINCIPALES TIPOS DE INMOVILIZACIÓN.....	21
FIGURA 3. PROCESO SOL-GEL Y PRODUCTOS QUE PUEDEN OBTENERSE.....	23
FIGURA 4. ESTRUCTURAS CRISTALINAS DEL DIÓXIDO DE TITANIO (TiO ₂), A) ANATASA, B) RUTILO, C) BROQUITA, D) B-TiO ₂	30
FIGURA 5. DIAGRAMA DE FASES (TIEMPO VS TEMPERATURA) DEL TiO ₂	34
FIGURA 6. ESQUEMA DE REACCIÓN DE LAS ENZIMAS EN LA HIDROXILACIÓN DE MONOFENOLES Y LA DESHIDROGENACIÓN DE O-FENOLES A O-QUINONAS.....	38
FIGURA 7. DIFRACCIÓN DE LOS RAYOS X EN LOS PLANOS CRISTALINOS DE UN SÓLIDO.	40
FIGURA 8. FWHM DE LOS PICOS DE DIFRACCIÓN.....	42
FIGURA 9. INTERFERÓMETRO DE MICHELSON.	46
FIGURA 10. DIAGRAMA ENERGÉTICO DE ESTADOS VIBRACIONALES Y TRANSICIONES PARA DIFERENTES INTERACCIONES LUZ-MATERIA	47
FIGURA 11. ESQUEMA GENERAL DE UN MICROSCOPIO DE BARRIDO.	49
FIGURA 12. COMPONENTES EN EL DIAGRAMA DE NYQUIST DE LA IMPEDANCIA Z.....	53
FIGURA 13. DIAGRAMAS DE BODE Z Y DIAGRAMA DE ÁNGULO DE FASE PARA LA FIGURA 11.....	54
FIGURA 14. ESPECTRO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DEL GRAFITO.....	63
FIGURA 15. MICROGRAFÍAS DE GRAFITO EN BARRA A) 700X, B) 2200X	64
FIGURA 16. ESPECTRO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE TiO ₂ SECADO A 60°C.....	64
FIGURA 17. ESPECTRO DE IR DE TiO ₂	65
FIGURA 18. ESPECTRO DE RAMAN DE TiO ₂ SECADO A 60°C.....	66
FIGURA 19. MICROGRAFÍA DE TiO ₂ EN POLVO A) 8000X, B) 10,000 X.....	66
FIGURA 20. MICROGRAFÍA DE MET DE TiO ₂ EN POLVO.	67
FIGURA 21. MICROGRAFÍA MET DE ALTA RESOLUCIÓN TiO ₂ EN POLVO.	68
FIGURA 22. ESPECTROS DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LAS MEZCLAS TiO ₂ : PVA.....	69
FIGURA 23. ESPECTROS DE IR DE LA MUESTRA TiO ₂ -PVA 1:1.....	71
FIGURA 24. MICROGRAFÍA DE LA MEZCLA TiO ₂ -PVA 1:1 A) 5000X, B) 10000X.	72
FIGURA 25. ESPECTRO DEL ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL DE TiO ₂ -PVA 1:1.....	72
FIGURA 26. MICROGRAFÍA DE MET DEL TiO ₂ -PVA 1:1.....	73
FIGURA 27. ESPECTRO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DEL RECUBRIMIENTO DE TiO ₂ -PVA 1:1 SOBRE GRAFITO.	74
FIGURA 28. ESPECTROS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE RECUBRIMIENTOS DE TiO ₂ -PVA SOBRE GRAFITO.	75
FIGURA 29. RECUBRIMIENTOS DE TiO ₂ -PVA 1:1, A) 10,000X, B) 30,000X.....	75

FIGURA 30. ESPECTRO DE ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL DEL RECUBRIMIENTO TiO ₂ -PVA 1:1 EN GRAFITO.	76
FIGURA 31. MICROGRAFÍA DEL ESPESOR DEL RECUBRIMIENTO TiO ₂ -PVA 1:1 Y SU ANÁLISIS QUÍMICO ELEMENTAL.	77
FIGURA 32. ESPECTRO DE EIS EN DIAGRAMA DE NYQUIST DEL RECUBRIMIENTO TiO ₂ -PVA 1:1.....	79
FIGURA 33. DIAGRAMA DE BODE, A) MÓDULO DE LA IMPEDANCIA VS Fz, B) ÁNGULO DE FASE VS Fz.....	80
FIGURA 34. DIAGRAMA DE EIS DEL RECUBRIMIENTO TiO ₂ -PVA 1:1.....	81
FIGURA 35. DIAGRAMA DE BODE, A) MÓDULO DE LA IMPEDANCIA VS FRECUENCIA, B) ÁNGULO DE FASE VS FRECUENCIA.....	82
FIGURA 36. DIAGRAMAS DE IMPEDANCIA, 1. DIAGRAMA DE NYQUIST, 2. DIAGRAMAS DE BODE.	83
FIGURA 37. CEE UTILIZADO PARA EL AJUSTE DE LOS DIAGRAMAS DE IMPEDANCIA OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.	84

Índice de tablas

TABLA 1. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN EMPLEADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE BIOSENSORES.	20
TABLA 2. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS FASES CRISTALINAS DE LA TITANIA.	31
TABLA 3. MÉTODOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.	43
TABLA 4. TAMAÑO DE CRISTAL CALCULADO POR LA ECUACIÓN DE SCHERRER.	69
TABLA 5. VALORES DE LOS COMPONENTES EN EL CIRCUITO ELÉCTRICO EQUIVALENTE.	85

Resumen

En este trabajo se realizaron recubrimientos de TiO_2 , el cual fue obtenido por la técnica Sol-gel y mezclado con el polímero PVA para lograr una completa adhesión al grafito, sustrato que fue empleado como base en los recubrimientos. Las técnicas de caracterización empleadas mostraron que el sol de TiO_2 sintetizado se obtuvo en fase cristalina anatasa. Se realizaron mezclas de TiO_2 -PVA en las proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 respectivamente, los análisis estructurales mostraron que la relación TiO_2 -PVA 1:1 fue la proporción óptima, ya que dicha relación mantuvo presente la estructura cristalina anatasa. En los análisis morfológicos de SEM los recubrimientos TiO_2 -PVA 1:1, presentaron una superficie rugosa con partículas esféricas en el orden en nanométrico y con un espesor de aproximadamente 15 μm . Mediante Espectroscopía de Impedancia electroquímica se analizaron los recubrimientos, de la interface recubrimiento-solución y recubrimiento-electrodo. Los espectros de impedancia fueron ajustado a un circuito eléctrico equivalente, obteniendo valores de una resistencia a la solución (R_s) de 12.29-56.01 Ω para los electrodos blanco sin recubrimiento y una R_s de 59.39-67.95 Ω para los electrodos con recubrimiento de TiO_2 -PVA 1:1, mientras que la resistencia a la transferencia de carga (R_p) se obtuvieron valores de 6823-23756 Ω para electrodos sin recubrimiento y valores de R_p de 2240-1.737 E+11 para electrodos con recubrimiento; la capacidad de la doble capa (CPE_{dl}) para electrodos blanco, mostró valores de 9.42 E-04-1.756 E-04 Fcm^{-2} y con recubrimiento valores de 4.309 E-04-6.47 E-04 Fcm^{-2} y finalmente los valores de n fueron de 0.4896-0.7976 indicando que el comportamiento de CPE_{dl} del recubrimiento presentan un proceso difusivo característico para recubrimientos no homogéneos.

Palabras claves: Recubrimientos, TiO_2 , anatasa, impedancia, interface.

Abstract

In this work, TiO₂ coatings were made, which was obtained by the sol-gel technique and mixed with the PVA polymer to achieve complete adherence to the graphite substrate was used as the basis in the coatings. Characterization techniques used showed that the synthesized TiO₂ sol was obtained in anatase crystalline phase. Mixtures realized TiO₂-PVA at 1:1, 1:2 and 1:3 respectively, structural analyzes showed that the TiO₂-PVA ratio 1:1 was the optimum, since that relationship crystalline structure remained present anatase. In SEM morphological analysis of TiO₂-PVA coatings 1:1, had a rough surface with spherical particles in nanometer order and with a thickness of about 15 μm. Using electrochemical impedance spectroscopy coatings were analyzed, of the coating-solution interfaces and electrode coating. The impedance spectra were adjusted to an equivalent electrical circuit, obtaining values a solution resistance (Rs) of 12.29-56.01 Ω for uncoated white electrodes and Rs 59.39-67.95 Ω for electrodes coated TiO₂ PVA 1:1, whereas the resistance to charge transfer (Rp) values were obtained from 6823-23756 Ω electrode uncoated and Rp values of 2240-1737 E +11 coated electrode, the ability of the double layer (CPE_{dl}) to white electrodes showed values of 9.42 E-04-1756-04 E-2 Fcm⁻² and coated electrodes values 4.309 E-04 6.47-E-04-2 Fcm⁻² and finally n values were calculated from 0.4896 to 0.7976, indicating that the coating CPE_{dl} behavior exhibit a characteristic diffusion process for inhomogeneous coatings.

Key words: Coatings, TiO₂, anatase, impedance, interface.

Estructura de la tesis

El presente documento se encuentra estructurado por siete Capítulos, referencias bibliográficas, y anexos.

El 0se establece el estado del arte donde se analiza la importancia que tiene en uso de los biosensores como técnicas alternativas a los métodos analíticos actualmente utilizados y que requieren de largos tiempos de análisis, estos biosensores pueden ser aplicados en diferentes áreas de interés como la agroalimentaria, ambiental, biomédica, farmacéutica etc.

El Capítulo 2 se presenta la justificación e importancia para la realización de este trabajo. En el Capítulo 3 se da la hipótesis planteada en el inicio de este trabajo y el Capitulo 4 corresponde a los objetivos establecidos para la realización del trabajo.

El **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**se refiere a materiales y métodos, onde se dan las características de los reactivos y equipos utilizados, la metodología utilizada para cumplir con los objetivos establecidos. El **¡Error! No se encuentra el origen de la eferencia.**corresponde a la presentación de resultados y su discusión. En lo que se refiere al 7se establecen la conclusión y las perspectivas para trabajos futuros.

En último lugar, se presentan tres apartados, el primero incluye las referencias bibliográficas que sustentan la información incluida en la presente tesis, el segundo contiene el listado de los trabajos presentados en congresos, derivados de los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad de contar con resultados de análisis precisos y confiables para el monitoreo y el control de procesos químicos, ha originado el desarrollo de nuevos y sofisticados métodos que requieren altos costos en instrumentación, instalación y mantenimiento, lo que ha dado lugar a la aparición de los sensores, cuyo objetivo principal es proporcionar información cualitativa y cuantitativa de un determinado proceso químico en función del tiempo; información que además de permitir la monitorización y el control de los parámetros de calidad, también pueden ser útiles para optimizar el consumo de energía y de materias primas, la duración del proceso y el aspecto final del producto terminado (Montañez *et al.*, 2011).

Se han desarrollado sensores pequeños, sencillos y versátiles, dispositivos que permiten simplificar la adquisición de información analítica, sin renunciar a la selectividad y sensibilidad que brindan los poderosos métodos instrumentales de análisis (González *et al.*, 2005).

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que puede ser procesada y, por tanto, facilita la información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis complejos. Los sensores químicos están constituidos por dos partes principales: un elemento de reconocimiento molecular o receptor que sólo reconoce al analito por cuantificar, y un elemento transductor de la señal de reconocimiento, en cuya superficie se encuentra inmovilizado el receptor (Jiménez *et al.*, 2009).

La escasa versatilidad en la disponibilidad de receptores sintéticos es determinante y los sensores químicos presentaban un cierto grado de reconocimiento limitado, lo que originó el uso de materiales biológicos como elementos de reconocimiento molecular, mucho más selectivos y versátiles que los de tipo sintético. A estos sensores químicos que incorporan materiales biológicos como elementos de reconocimiento molecular, se les dio el nombre de biosensores. Debido a su alta selectividad y sensibilidad, las enzimas destacan como los elementos de reconocimiento molecular más utilizados en la construcción de biosensores (Montañez *et al.*, 2011).

Gracias al apoyo de la biotecnología, los biosensores actualmente suponen potentes herramientas de análisis con aplicaciones en la industria agroalimentaria medioambiental, químico, farmacéutico, etc. En la industria agroalimentaria, las tres grandes áreas de aplicación

de los biosensores son: seguridad alimentaria, calidad alimentaria y control de procesos (González *et al.*, 2005).

En los últimos 30 años, los biosensores electroquímicos han cobrado gran importancia. Esto ha sido debido a la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costos en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área pequeña de los dos o tres electrodos requeridos para la realización de medidas electroquímicas (Cano, 2008).

La etapa clave para en el diseño o construcción de los biosensores es la técnica de inmovilización, ya que esta etapa es limitante en la estabilidad y reproducibilidad del biosensor. Las técnicas de inmovilización pueden ser por unión covalente, adsorción, atrapamiento en una matriz, adicional a estas técnicas de inmovilización se ha reportado la tecnología sol-gel como alternativa en las estrategias de inmovilización de biomoléculas, esta técnica permite la preparación de redes tridimensionales adecuadas para la encapsulación de una gran variedad de biomoléculas. Los materiales sol-gel inorgánicos son particularmente atractivos para la fabricación de biosensores enzimáticos debido a las adecuadas condiciones ambientales empleadas en su preparación, permitiendo obtener materiales con porosidad, alta estabilidad térmica e inercia química, y a que este tipo de material, a diferencia otros, no se hidrata en disolución acuosa.

1 ESTADO DEL ARTE DE LOS BIOSENSORES

1.1 Biosensores

Un biosensor se define como un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico o biomimético. Donde el elemento biológico puede ser un ácido nucleico, una enzima, un anticuerpo, un receptor, un tejido o una célula. Mientras que un elemento biomimético lo constituyen los polímeros de impresión molecular (PIMs), aptámeros, Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs). Estos elementos se encuentran asociados a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito.

Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físico-químicas: pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, entre otras, que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica que es indicativa de la presencia del analito que se quiere analizar o proporcional a su concentración en la muestra (González *et al.*, 2005).

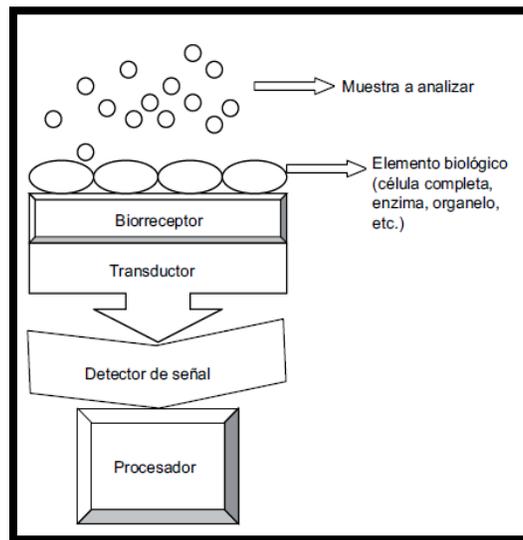


Figura 1. Esquema general de un biosensor.

Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización, alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. El primer biosensor fue enzimático diseñado en 1962, empleado para determinar la concentración de glucosa en sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa y acoplado la enzima a un electrodo selectivo de oxígeno. Posteriormente, las enzimas inmovilizadas se fortalecieron en el diagnóstico clínico permitiendo el desarrollo de otros biosensores (Jiménez y León, 2008).

Los biosensores poseen una serie de características entre las que destacan su alta sensibilidad y especificidad, bajo costo y manejo sencillo, tiempo de análisis cortos, además permiten realizar análisis en tiempo real, pudiendo ser reproducibles y miniaturizados, estas características de los biosensores los hacen ampliamente aplicables para el aseguramiento de la calidad fisicoquímica, microbiológica, composición y la vida útil de los alimentos (González *et al.*, 2005; Jiménez y León, 2008).

1.1.1 Clasificación

Los biosensores, generalmente se clasifican dependiendo de la naturaleza del material biológico y en función del sistema de transducción utilizado (González *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007).

1.1.2 Naturaleza de material biológico

a) Biosensores catalíticos, cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o células. Se basan en la utilización de biocatalizadores que son elementos capaces de producir una reacción química sin consumo del biocatalizador, regenerándose y poder ser utilizado de nuevo. Pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participen en la reacción, detectando la desaparición de algún co-sustrato o la aparición de otro producto. Para aumentar la estabilidad del material biológico se utilizan distintos sistemas de inmovilización que se describen posteriormente. (González *et al.*, 2005).

b) Biosensores de afinidad, donde los receptores son anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores celulares, etc. Estos biosensores se basan en la interacción del analito de interés con el

elemento de reconocimiento, sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción en la que se forma un complejo analito-receptor. Para medir la interacción, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele utilizar un marcador del receptor o de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor. El inconveniente de este sistema es la necesidad de incluir pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas y la adición de sustratos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcador (Jiménez y León, 2008).

1.1.3 Sistema de Transducción

El sistema de transducción o transductor es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. La señal generada por el transductor en algunos casos no puede ser interpretada directamente y es necesaria la utilización de un software para su procesamiento.

Existen varios tipos de transductores dependiendo de la naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito se puede utilizar un tipo de transductor u otro (González *et al.*, 2005).

a) Ópticos: Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la radiación electromagnética (REM) como consecuencia de la interacción física o química entre el analito y el elemento biológico. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en la absorción de REM, luminiscencia, dispersión de REM o índice de refracción, cuando la radiación incide sobre las superficies de reconocimiento. El sistema básico de medida consiste en una fuente de REM, el elemento biológico (donde se encontrarían las moléculas receptoras) y el detector (Jiménez y León, 2008).

b) Térmicos: Se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración de analito. Estos cambios de temperatura normalmente se determinan por medio de termistores a la entrada y a la salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas. Presentan como inconveniente

que pueden existir pérdidas de calor por irradiación, conducción o convección (González *et al.*, 2005).

c) Piezoelectrónicos: Los sistemas de transducción piezoeléctricos, másicos, gravimétricos o acústicos miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Los materiales que se utilizan para el diseño de este tipo de biosensores son materiales piezoeléctricos. Estos cristales se recubren con el elemento de reconocimiento que suele ser de bioafinidad y se ponen en contacto con la muestra que contiene el analito. La señal medida es la variación observada en la frecuencia de oscilación antes y después de que se produzca la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito (Jiménez y León, 2009).

d) Nanomecánicos: En este tipo de biosensores, el elemento de reconocimiento biológico se inmoviliza sobre la superficie de una micropalanca de silicio, que se sumerge en una muestra líquida. Generalmente se utilizan anticuerpos como elementos de reconocimiento. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido y la micropalanca sufre una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión o de la frecuencia de resonancia, la magnitud de este cambio está relacionada con la concentración de analito (González *et al.*, 2005).

e) Electroquímicos: Los transductores electroquímicos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica. Proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa. El elemento de reconocimiento biológico y el elemento de transducción deben estar en íntimo contacto (Sánchez-Paniagua, 2008).

Se diferencian cuatro tipos de biosensores electroquímicos: potenciométrico, conductimétrico, amperométrico e impedimétrico. En función de si detectan cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia (González *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007).

Siendo los biosensores electroquímicos los más utilizados en el área alimentaria (Flores *et al.*, 2010).

1.1.4 Electroodos o base del Transductor

Una de las ventajas de los biosensores electroquímicos es que los materiales utilizados en la construcción de los sensores son simples y accesibles. Su principal requerimiento es que sean materiales conductores. Pueden utilizarse metales nobles como el oro, platino, los derivados del grafito, como el carbón vítreo, o bien materiales compuestos denominados compósitos conductores preparados a partir de diferentes materiales como el polvo de grafito dispersado sobre un polímero aislante y los micro o nanoestructurados (Zacco, 2006).

Los transductores nanoestructurados son electrodos construidos o modificados con materiales que tienen dimensiones en el intervalo de 1 a 100 nanómetros (nm). Por ejemplo: nanopartículas; nanotubos, nanocapas, y materiales nanoporosos. Las nanopartículas, son generalmente definidas como partículas microscópicas con al menos una dimensión menor a 100nm, pero los aglomerados de las partículas pueden tener diámetros mayores a los 100 nm (Andrade, 2007).

Así, el material modificador se elige de tal manera que sea selectivo (e incluso específico) a un analito en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, sobre el electrodo sin modificar. De esta forma, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y el analito en disolución están fuertemente influidos por las características del modificador empleado. La gama de especies modificadoras es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros, (Cano, 2008). Entre estos materiales modificadores se encuentra el Óxido de Titanio.

1.1.5 Sistemas de inmovilización

Una etapa clave en la construcción de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre una membrana o matriz, que a su vez se fija a la superficie del transductor. Este material de base puede actuar únicamente como soporte del componente biológico o participar además en la transmisión de la señal al sistema de transducción. La elección de uno u otro procedimiento depende de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor, características

importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad, dependen de la metodología de inmovilización utilizada (González *et al.*, 2005).

Las técnicas empleadas para la inmovilización del biomaterial incluyen: métodos físicos como la adsorción, encapsulación o atrapamiento y métodos químicos como el entrecruzamiento y las uniones covalentes. En la Tabla 1 se resumen las principales características de cada una de las técnicas de inmovilización empleadas en la construcción de los biosensores (González *et al.*, 2005).

Tabla 1. Técnicas de inmovilización empleadas en la construcción de biosensores.

Técnica de Inmovilización	Descripción	Matriz	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción física	Unión del ER* a la matriz mediante interacciones iónicas, puentes de hidrogeno, Fuerzas de Van der Waals	Celulosa. Gel de sílice. Colágeno. Hidroxiapatita. Acetato.	Sencilla. Bajo costo. Matriz regenerable. Sin modificaciones del ER	Unión débil: pérdida de ER por condiciones externas. Control estricto de proceso
Atrapamiento	Retención física del ER en las cavidades interiores de la matriz	Geles: agar, nylon, policrilamida. Matrices electródicas compositas rígidas.	Sencilla. Bajo costo. Se necesita poca cantidad de ER. Sin modificaciones de ER. Proximidad entre el ER y el transductor.	Unión débil. Control estricto de la polimerización de la matriz. No regenerable.

Entrecruzamiento	Uniones irreversibles de los ER entre sí mediante reactivos funcionales	Reactivos: Glutiraldehído, aminas etc.	Costo moderado. Estable en condiciones extremas. Mínima pérdida de ER.	Tratamiento con sustancias químicas tóxicas. No regenerable.
Enlaces covalentes	Uniones covalentes del ER con grupos químicos activados o directamente del transductor.	Agarosa, celulosa, cefasora CL-6B	Manipulación sencilla. Estable en condiciones extremas.	Alteración del ER (centro activo en enzimas). Inadecuado para ER muy sensibles (pH, temperatura). No regenerable. Tratamiento con sustancias químicas tóxicas. Costo elevado.

*ER: elemento de reconocimiento. (González *et al.*, 2005)

En la Figura 2 aparecen esquematizados los tipos de inmovilización más usuales en la construcción de biosensores y descritos en la Tabla 1.

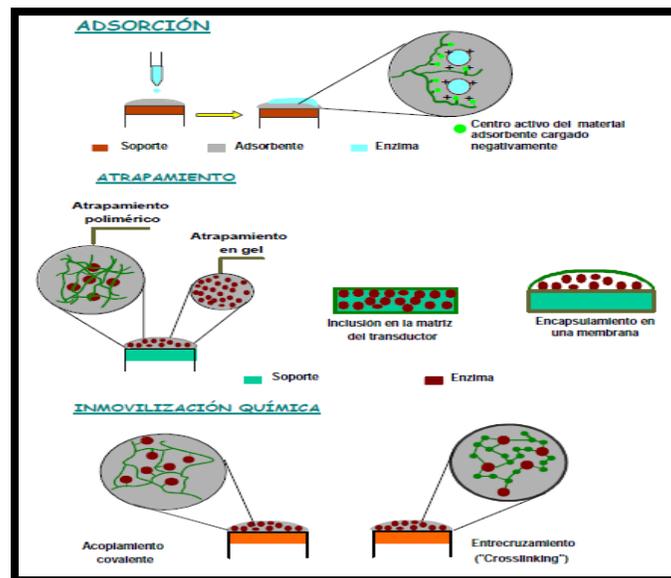


Figura 2. Principales tipos de inmovilización.

Además de los cinco tipos de inmovilización, se han investigado otros mecanismos alternativos. En las que se encuentra, las técnicas de sol-gel, monocapas autoensambladas y membranas lipídicas que se están empleando con éxito en el campo de los biosensores (Sánchez-Paniagua, 2008).

La técnica sol-gel es un método atractivo para la inmovilización de biomoléculas como las enzimas. Comparada con otros tipos de inmovilización las películas de sol-gel tienen algunas ventajas tales como atrapamiento de grandes cantidades de enzima, fácil acceso al sustrato, preparación simple sin modificación covalente, flexibilidad y control en el tamaño de poro y geometría (Kochana *et al.*, 2008).

1.2 Proceso sol-gel

El método sol-gel se ha constituido como un proceso prometedor para la manufactura de vidrios y cerámicas. Este método ha generado gran interés científico y tecnológico y su futuro empleo dependerá de la posibilidad de fabricar mejores materiales o productos completamente nuevos, esto exige un mayor conocimiento de los fenómenos fisicoquímicos que ocurren durante el proceso (Guzmán *et al.*, 2007).

A pesar de ser uno de los procesos más empleados para la obtención de los nuevos materiales cerámicos, este tiene su origen a mediados del siglo XIX, cuando Ebelman y Graham's iniciaron sus estudios sobre el gel de sílice.

En general, el proceso sol-gel implica la transición de un sistema en estado líquido, "sol" (suspensión coloidal de partículas sólidas de tamaño de ~1-1000 nm, que están en esta condición gracias al movimiento Browniano), a una fase sólida denominada "gel" (sólido constituido por al menos dos fases, donde la fase líquida se encuentra atrapada e inmovilizada por la fase sólida), (Brinker y Scherrer, 1990).

Las reacciones más importantes que ocurren en el sistema, durante la formación del sol y su transición a gel, son las de hidrólisis y condensación. Los precursores usados en la preparación del "sol" son sales metálicas inorgánicas y, más frecuentemente, compuestos metal-orgánicos (alcóxidos), (Brinker y Scherrer, 1990).

El sol puede prepararse en medio ácido, básico o neutro. El pH del sol modifica substancialmente tanto la estructura de las partículas, como las propiedades de los óxidos. Adicionalmente, el pH controla el tiempo de reacción modificando las reacciones de hidrólisis y de condensación.

En el sistema se forman cadenas de partículas sólidas, pequeñas e inmersas en el líquido (solvente orgánico o acuoso). Las partículas sólidas, o las cadenas de partículas, son tan pequeñas, de 1 a 1.000 nm, que las fuerzas gravitacionales son despreciables y las interacciones que predominan son las de tipo Van der Waals, coulombicas y estéricas; el “sol” es estabilizado por la repulsión estérica, el efecto de la doble capa o la combinación de las anteriores. La transformación del sol a gel permite obtener materiales cerámicos con diversas formas y la obtención de películas finas sobre un sustrato. Cuando el “sol” se coloca en un recipiente, preferentemente de vidrio, se forma un “gel húmedo” que con un secado y un tratamiento térmico posterior se convierte en un polvo cerámico (Ochoa *et al.*, 2010).

Si se remueve mediante un tratamiento térmico convencional el resultado es un xerogel. Si se remueve a través de evacuación supercrítica, el resultado es un aerogel. En la Figura 3 se muestra el diagrama general del proceso sol-gel.

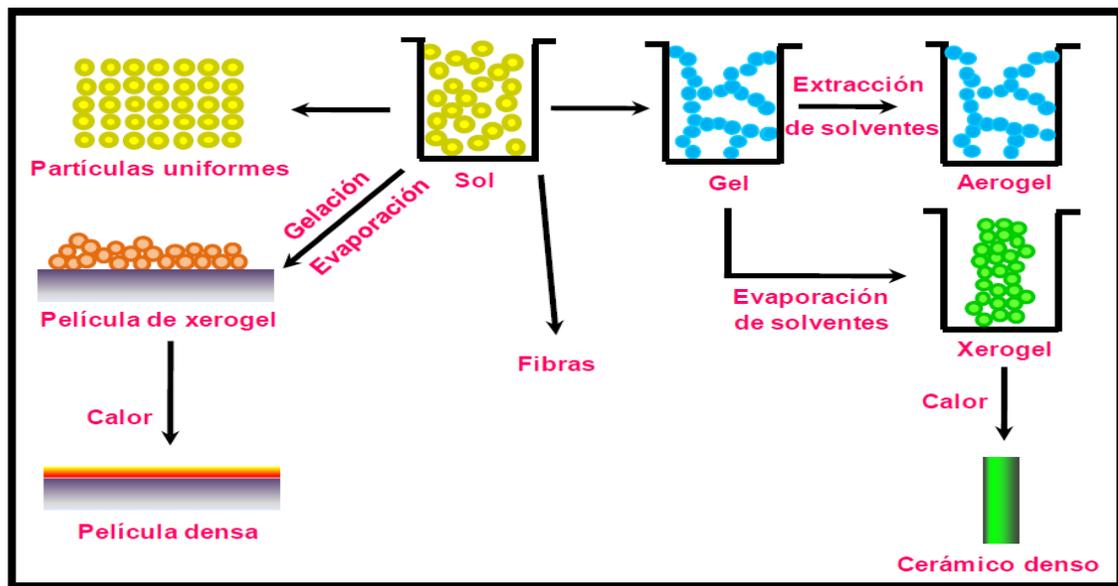


Figura 3. Proceso sol-gel y productos que pueden obtenerse.

1.2.1 Precursores empleados en el proceso sol-gel

Básicamente existen tres tipos de precursores empleados en el proceso sol-gel, dependiendo de la clase de ligandos enlazados con el óxido metálico, los cuales son:

- a) Alcóxidos: El ligando es un alcohol desprotonado que suele reaccionar con la humedad del aire, por lo que se requiere un control adecuado de la atmosfera durante el procesamiento. Los alcóxidos metálicos son los más utilizados porque reaccionan rápidamente con el agua.
- b) Carboxilatos metálicos: Son productos resultantes de la reacción de sales metálicas y ácidos orgánicos. El ligando es un ácido orgánico desprotonado. Son compuestos pocos volátiles y de difícil descomposición.
- c) B-dicetonas son compuestos que se utilizan como agentes acomplejantes, los cuales poseen dos oxígenos resonantes con una gran capacidad quelante, alta volatilidad y gran capacidad polimerizante cuando están coordinadas con un metal y a su vez se descomponen a temperatura muy baja.

Generalmente los alcóxidos metálicos son ampliamente utilizados como precursores moleculares para la síntesis de óxidos metálicos, ya que son especies muy reactivas. Las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren rápidamente con el simple hecho de adicionarle agua. Además, también reaccionan con una gran variedad de compuestos químicos que contienen grupos hidróxido nucleofílicos (Guzmán *et al.*, 2007).

1.2.2 Reacciones en el proceso sol-gel

El mecanismo de reacción por el cual se tiene la transición de sol a gel es probablemente, una sustitución nucleofílica bimolecular en presencia de un catalizador básico, y una sustitución electrofílica cuando se tiene un catalizador ácido.

A nivel grupo funcional, dos reacciones son las más importantes para describir el proceso sol-gel: la hidrólisis y la condensación; es difícil separar estas dos reacciones ya que ambas se llevan a cabo de manera simultánea, formando intermediarios como: grupos etoxi (-M-OR), grupos hidroxilo (-M-OH) grupos metaloxano -(M-O-M). Las reacciones que se llevan a cabo en el proceso sol-gel son las siguientes:

Hidrólisis:

La hidrólisis ocurre cuando el alcóxidos y el agua son mezclados, utilizando como disolvente el alcohol correspondiente, el cual se tiene como subproductos de la reacción, como se indica en la reacción correspondiente a la hidrólisis.



Condensación:

En la reacción de polimerización o condensación, reaccionan entre si los grupos intermediarios formados en la reacción de hidrólisis para generar redes poliméricas del tipo –M-O-M-. Esta última reacción determina la estructura primaria de los geles así como sus propiedades.

Como las reacciones, tanto de hidrólisis como de condensación, se llevan a cabo casi simultáneamente, estas no se realizan de manera total. Es importante hacer notar que la reacción de condensación tiene gran influencia sobre la gelificación, pues se puede llegar a la precipitación, o alternativamente a la formación del gel, dependiendo de las condiciones de esta reacción (Guzmán *et al.*, 2007).



En donde:

M= Si, Al, Mg, Ti, etc.

R= Radical

Las reacciones de hidrólisis y condensación son muy sensibles a las siguientes condiciones experimentales:

- a) pH de la reacción
- b) Concentración del agua
- c) Concentración del disolvente
- d) Tiempo de reacción

1.2.3 Gelación

Un gel, es una interconexión de una red rígida, con poros de dimensiones submicrométricas y cadenas poliméricas, con una longitud promedio mayor a 1 μm .

La gelación es el proceso cuando la solución pierde su fluidez y toma la apariencia de un sólido elástico. Consiste en la formación de grupos por la condensación de polímeros y agregación de partículas porque hay choques de los coloides. Los puentes que se forman entre los grupos son para producir un grupo único y gigante que será llamado gel. El grupo gigante que se aproxima al tamaño del recipiente que los contiene, por lo tanto no está puro. Al momento que el gel se forma, muchos grupos están presentes en la fase del sol, enredados, pero no unidas al grupo gigante, con el tiempo, progresivamente se conectarán a la cadena y el tamaño del gel crecerá.

1.2.4 Envejecimiento

El término envejecimiento se aplica al proceso de cambio en la estructura y propiedades después de la gelación. Envejecimiento involucra la condensación, disolución, re-precipitación y transformación de fase dentro de las fases sólidas o líquidas. Algunos geles reciben una reducción espontánea, llamada sinéresis (formación de enlace a atracción entre películas que inducen a la contracción de la red o expulsión del líquido de los poros). El gel debe ser depositado por un periodo de tiempo, horas o días. Durante esta etapa, la poli-condensación continúa a lo largo con una solución y la re-precipitación del gel. La resistencia del gel incrementa con el envejecimiento. Un gel envejecido debe desarrollar suficiente fuerza para resistir el rompimiento durante el secado.

1.2.5 Secado

El secado de geles se lleva a cabo después de que se ha alcanzado el punto de gelificación, e involucra una serie de procesos al secar y dar tratamiento térmico a estos tales como: evaporación de agua ocluida en el gel, evaporación del disolvente, eliminación de residuos orgánicos, deshidroxilación del gel, al igual que los cambios estructurales que sufre el material.

El secado por evaporación bajo condiciones normales incrementa la presión capilar que causa la disminución de la red del gel, dando como resultado un gel seco llamado xerogel, el cual algunas veces reduce su volumen por un factor de 5 a 10 comparado con el gel húmedo original.

Durante el secado el líquido es removido de la red porosa interconectada. En esta etapa grandes tensiones de capilaridad pueden desarrollarse cuando los poros son pequeños (menores a 20 nm). Estas tensiones provocan un rompimiento catastrófico de los geles, a menos que el proceso de secado sea controlado por decremento de la energía del superficie del líquido, por adición de surfactantes o eliminación de poros muy pequeños, o por evaporación hipercrítica, a cual evita las interfaces sólido-líquido o por obtención de tamaño de poros monodispersos, controlando los rangos de hidrólisis y condensación.

Un tratamiento térmico a altas temperaturas del gel poroso favorece una densificación eliminando la mayor cantidad de poros. La temperatura de densificación depende considerablemente de las dimensiones de la red del poro, la conectividad de los poros y el área superficial de la estructura. El tratamiento térmico de un gel poroso se lleva a cabo a temperaturas elevadas (~500 °C), denominándose sintonización.

Dependiendo del procedimiento experimental empleado (tipo de precursores, tipo de depósito y tratamiento térmico, etc.), el método sol-gel presenta algunas diferencias, las cuales influyen en el producto final: películas delgadas, polvos o monolitos (Brinker y Scherrer, 1990). El proceso de obtención de polvos cristalinos a partir del gel se muestra en la Figura 3.

1.2.6 Materiales obtenidos por el proceso Sol-gel

Los materiales obtenidos por sol-gel, basados en la hidrólisis y condensación de compuestos de alcóxidos de metales $M(OR)_x$, tienen diferentes posibles usos como la formación de cerámicas ópticas, electrónicas y estructurales, en forma de fibras, recubrimientos, películas delgadas y materiales compuestos (Dimitriev, 2008).

En la actualidad, dicha técnica tiene un área de aplicación muy extensa, la diversidad de materiales y sus potenciales usos pueden englobarse en los siguientes campos:

- **Películas delgadas o recubrimientos:** Aplicaciones ópticas, electrónicas, protectivas y recubrimientos o películas delgadas porosas.

- **Monolitos:** Materiales en volumen secados sin fracturas. Aplicaciones en componentes ópticos, super-aislamiento.
- **Polvos granos y esferas.** Uso de polvos como precursores cerámicos, granos abrasivos, aplicaciones de esferas densas o huecas ya sea cerámicas o vítreas.
- **Fibras:** Obtenidas directamente de sólidos viscosos, usados principalmente para refuerzo o fabricación de textiles refractarios.
- **Compuestos.** Geles usados como matrices para compuestos reforzados con fibras o partículas y como anfitriones de fases orgánicas, cerámicas o metálicas.
- **Geles porosos y membranas.** Aplicaciones resultantes de la habilidad de adaptar la porosidad de membranas delgadas, así como xerogeles (geles secos) o aerogeles (Macwan *et al.*, 2011)

1.2.7 Ventajas y desventajas del proceso sol-gel

El proceso sol-gel, es uno de los métodos de síntesis de mayor auge en los últimos años. Además de ser un proceso que no requiere condiciones especiales para su desarrollo podemos mencionar algunas de las muchas ventajas de este método.

- Los precursores usados en el proceso sol-gel (alcóxidos metálicos y las soluciones de sales inorgánicas) pueden ser purificados fácilmente.
- Los materiales obtenidos presentan gran homogeneidad y pureza.
- Se puede dopar al material con una gran cantidad de diferentes materiales tanto orgánicos como inorgánicos.
- Existe la formación de pre-redes inorgánicas en la solución.
- La velocidad de reacción y las propiedades del sólido final pueden ser controladas desde la primera etapa del proceso.
- Se puede controlar el grado de hidroxilación en la superficie del sólido final.
- La estructura de los geles obtenidos, puede ser controlada desde la reacción de hidrólisis mediante la adición de catalizadores ácidos o básicos.
- Se minimizan las pérdidas por evaporación.
- Se minimiza la contaminación del aire.
- Se pueden formar nuevas fases cristalinas a partir de sólidos no cristalinos.

- Las estructuras cristalinas de TiO_2 pueden obtenerse tanto como en condiciones ambientales ($T \leq 100^\circ\text{C}$) como a altas temperaturas (Brinker y Scherrer, 1990).

El método sol-gel además de ventajas tiene algunos inconvenientes los cuales se enlistan a continuación:

- Alto costo de los precursores.
- Alta contracción de los materiales de partida durante su proceso.
- Poros residuales muy finos.
- Grupos hidroxilos residuales.
- Carbón residual.
- Largos procesos de síntesis (Brinker y Scherrer, 1990).

1.3 Generalidades del Dióxido de Titanio

El titanio, es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y tiene lugar en la naturaleza sólo en combinación con otros elementos tales como oxígeno para formar TiO_2 . El dióxido de titanio (TiO_2), es un semiconductor tipo n sensible a la luz, que absorbe radiación electromagnética, principalmente en la región ultravioleta, además es un óxido anfótero muy estable químicamente, (Vargas *et al.*, 2011).

El dióxido de titanio (TiO_2) se presenta en la naturaleza en tres formas cristalinas: rutilo (estructura tetragonal simple), anatasa (estructura tetragonal centrada en el cuerpo) y broquita (estructura ortorrómbica). Otra fase no menos importante, pero a aun no se ha reportado nada sobre su influencia en la actividad fotocatalítica, es la $\beta\text{-TiO}_2$. Sin embargo, solo el rutilo y la anatasa tienen aplicación tecnológica. En la Figura 4, se observan las diferentes estructuras cristalinas del TiO_2 (Gupta *et al.*, 2011).

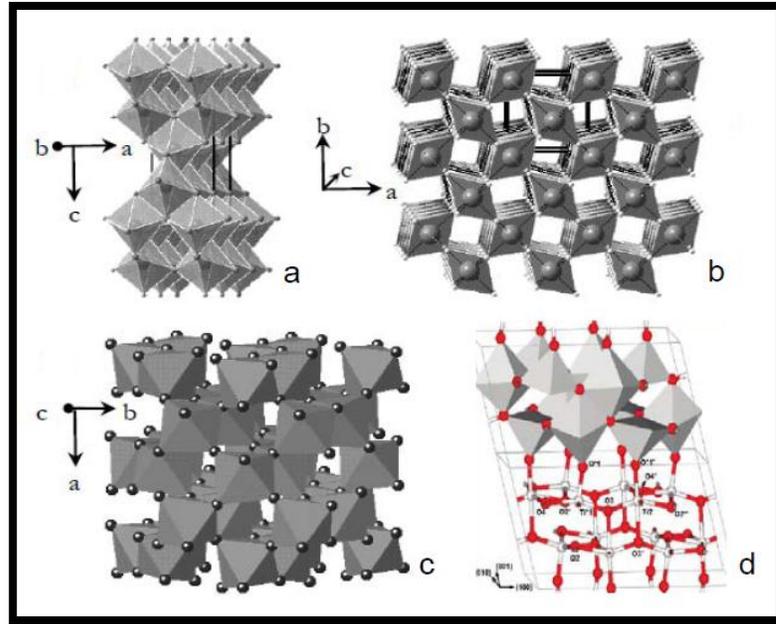


Figura 4. Estructuras cristalinas del Dióxido de Titanio (TiO_2), a) anatasa, b) rutilo, c) broquita, d) $\beta\text{-TiO}_2$

El dióxido de titanio rutilo y anatasa se producen industrialmente en grandes cantidades empleándose principalmente como pigmentos y catalizadores y en la producción de materiales cerámicos. El óxido de titanio, especialmente en fase anatasa, es ampliamente utilizado como fotocatalizador, por sus propiedades ópticas y eléctricas, bajo costo, estabilidad química y baja toxicidad, además es utilizado como recubrimiento anticorrosivo, etc., (Ochoa *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2011).

La estructura de TiO_2 se basa en la coordinación octaédrica de Ti^{4+} que se encuentra rodeado de seis átomos de O^{2-} , estando estos a su vez unidos a tres átomos de titanio con una configuración trigonal. Dependiendo de cómo se establezcan las uniones entre los octaedros unitarios, aparecen las cuatro modificaciones cristalinas mencionadas anteriormente (Figura 4). De este modo la anatasa y el rutilo cristalizan en el sistema tetragonal mientras que la brookita lo hace en el ortorrómbico y la $\beta\text{-TiO}_2$ en la monoclinica (Gupta *et al.*, 2011).

Tabla 2. Propiedades físicas de las fases cristalinas de la Titania.

Propiedad	Rutilo	Anatasa	Brookita
Estructura cristalina	Tetragonal	Tetragonal	Ortorrónica
Celda unitaria	2	4	8
Volumen de celda unitaria nm³	0.03122	0.03407	0.03211
Densidad Kgm⁻³	4250	3895	4133
Índice de refracción	2.72	2.52	2.63
Band-gap, eV	3.05	3.25	2.20
Transformación de fase	Rutilo a líquido: a 1825 °C	Anatasa a rutilo: 600-1100 °C	Brookita a anatasa: 400-500 °C Brookita a rutilo: 500-600 °C
Capacidad calorífica (C°P 298.15J/mol °C)	55.06	55.52	
Índice de refracción	ng: 2.9467 np: 2.6506	ng: 2.5688 np: 2.6584	ng:2.809

(Gupta *et al.*, 2011).

La anatasa es la fase que exhibe mayor actividad fotocatalítica. En la naturaleza se presenta en grietas alpinas, arcillas, rocas, etc. Tiene una estructura tetragonal centrada en el cuerpo. Por calentamiento se transforma a rutilo, lo que aumenta su densidad.

El rutilo toma su nombre del mineral rutilo, que contiene un mineral de óxido de Ti (IV). Tiene aplicaciones importantes en la industria, ya que es la base del titanio metálico (IV) amorfo. Es el pigmento blanco más utilizado en el mundo. Está presente en la naturaleza en pegmatitas, grietas, alpinas, rocas de sedimentación etcétera.

Por otro lado, la brookita tiene una estructura ortorrónica. Esta fase sintética se utiliza en desodorizarían, protección de agentes atmosféricos e incluso para tratamiento de agua

residuales. El proceso de producción de brookita se basa en la reacción entre el tetracloruro de titanio (TiCl_4) y el ácido clorhídrico (HCl), que promueve la cristalización de esta. Esta fase cristalina pertenece al grupo de los hidrotermales, ya que se forman por disolución y precipitación, relacionados con la solidificación del magma en fisuras en rocas preexistentes.

La fase $\beta\text{-TiO}_2$ presenta una estructura monoclinica centrada en las bases. Esta es una de las fases del TiO_2 que menos se ha reportado (Macwan *et al.*, 2011).

1.3.1 Aplicaciones de TiO_2

Gracias a las propiedades químicas, ópticas, dieléctricas y semiconductoras de TiO_2 sus aplicaciones se han extendido a muy diversos campos científicos y tecnológicos:

- Más del 80% de la producción del Rutilo está destinada a su utilización como pigmento blanco en pinturas, papel, cerámicas, vidrios, etc.
- Fabricación de aparatos electrónicos tales como sensores de gas células fotovoltaicas y dispositivos de memorias.
- Construcción de superficies autolimpiables, para esterilizar espacios cerrados o con fines estéticos: fachadas de edificios.
- Componente de parabrisas, escaparates y espejos, para evita la formación de nieblas, aprovechando su carácter hidrofílico.
- Soporte catalítico de otras fases: metales nobles como Pt, en reacciones de hidrogenación, b) metales como Mo, W y V, en procesos de oxidación selectiva de hidrocarburos, reducción catalítica selectiva SCR.
- Fotocatalizador para la purificación de corrientes gaseosas o efluentes líquidos (Chen y Mao, 2007).

En los últimos años los materiales obtenidos por el proceso sol-gel son un tipo de matrices atractivas para la inmovilización de bioreceptores en la construcción de biosensores. Investigaciones recientes han demostrado que este tipo materiales pueden retener la actividad catalítica de la enzima. El TiO_2 obtenido por sol-gel es un material biocompatible debido a sus ventajas tales como: puede ser preparado bajo condiciones ambientales, rigidez física, inercia

química, alta estabilidad térmica y fotoquímica, menor hidratación, tanto en solución acuosa como en orgánica (Jiuhong *et al.*, 2003; Ting *et al.*, 2003).

Diversos sistemas de sol-gel, como sílice, alúmina, óxido de titanio se han reportado como materiales adecuados para la inmovilización de enzimas como la Glucosa Oxidasa (GOD), peroxidasa (HRP), la tirosinasa y otras biomoléculas (Kochana *et al.*, 2008).

1.3.2 Métodos de Obtención

Los métodos de obtención de TiO_2 pueden dividirse en dos métodos:

- Método en fase gas
- Método en fase líquida

Métodos en fase gas:

Hidrólisis en fase gas de TiCl_4 : En este proceso se incluye la mezcla completa de TiCl_4 gasificado con gases reactantes (hidrogeno oxígeno). El gas reactante presenta ebullición a altas temperaturas y entonces es cuando ocurre la disolución de TiCl_4 en los gases reactantes. Los polvos comerciales de Degussa P25 se elaboran usando este método.

Oxidación en fase gas TiCl_4 . Los polvos de Titania también pueden producirse por oxidación volátil de metales clorados (TiCl_4) a altas temperaturas usando reactores de aerosol con flama y presiones cercanas a la atmosférica.

Hidrólisis de alcóxidos de titanio en fase vapor. Los vapores de alcóxidos de titanio (Ti (OR)_4) y agua son rociados con gas nitrógeno en una cámara de hidrólisis. La reacción de hidrolisis ocurre rápidamente para formar partículas esféricas de TiO_2 .

Métodos en fase líquida:

Hidrólisis en fase líquida de TiCl_4 . La Titania también puede formarse por una reacción de hidrolisis en fase líquida. Esta ruta también ha sido usada comercialmente para preparar TiO_2 en forma de finas partículas. El TiCl_4 se solubiliza en agua y la reacción de hidrolisis toma lugar a altas temperaturas.

Método hidrotérmico. Este método usa soluciones como solventes y precursores a presiones y temperaturas elevadas. Los precursores más utilizados son el TiCl_4 y el $(\text{Ti}(\text{SO}_4)_2)$; (Chen y Mao, 2007).

Sol-gel. Es conocido como un método eficiente para preparar TiO_2 ya que favorece con facilidad la síntesis de materiales cerámicos. Una buena homogeneidad de la solución a escala molecular y un control adecuado de los parámetros experimentales, permiten la incorporación de una variedad de metales dopantes, polímeros etc., en la matriz de TiO_2 . Por todas las ventajas que ofrece este método, en la presente investigación se utilizó esta técnica como un método sencillo y eficiente para la preparación del material a utilizar (Chen y Mao, 2007).

La síntesis de TiO_2 por el proceso Sol-gel sigue las mismas reacciones y etapas que caracterizan al proceso. Así, una de las principales ventajas de este proceso es la obtención de materiales a bajas temperaturas, en condiciones ambientales. Se ha reportado una ruta para sintetizar TiO_2 a través del proceso Sol-Gel, en fase anatasa y rutilo a temperaturas $<100^\circ\text{C}$ a diferencia de los procesos usuales de síntesis, donde se emplean temperaturas superiores a los 400°C . Describieron a través de un diagrama de Temperatura vs. Tiempo, los intervalos de temperatura y tiempo adecuados para la formación en solución acuosa de las fases anatasa y la fase rutilo. En el diagrama de la Figura 5 se observan los rangos de temperatura y tiempo para la síntesis de las fases cristalinas de TiO_2 (Gopal *et al.*, 1997).

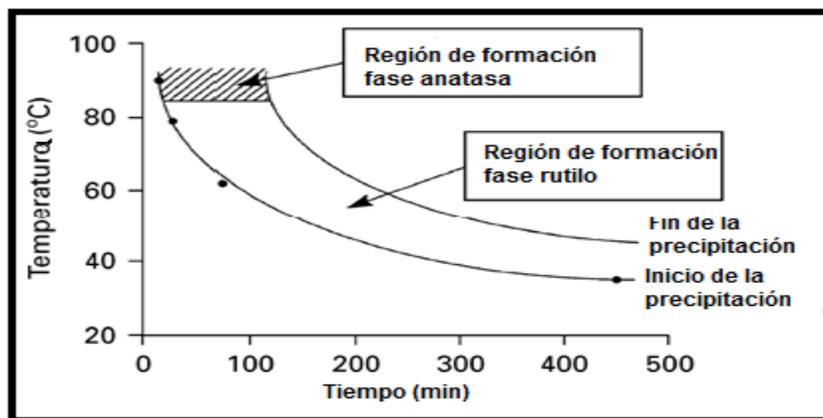


Figura 5. Diagrama de Fases (Tiempo vs Temperatura) del TiO_2 .

En un intervalo de temperatura de 80 a 90°C durante los primeros 20 minutos de calentamiento se inicia la hidrólisis del sol de Titania, presentándose un cambio de coloración en la solución (de transparente a una solución blanca y opaca), lo que indica el inicio de la formación de redes. Durante los posteriores 100 minutos se completa el tiempo necesario para que terminen las reacciones de policondensación y ese momento se obtiene la fase anatasa, (Gopal *et al.*, 1997).

Las características particulares del óxido metálico formado varían dependiendo de las condiciones experimentales. La estructura y morfología formada dependen tanto de parámetros internos como: la naturaleza del grupo alquílico y estructura molecular del precursor, como de parámetros externos tales como: la relación agua/metal alcóxido, temperatura, tipo de catalizador, solvente y concentraciones, etc. (Macwan *et a.*, 2011).

1.4 Películas por Técnica Sol-gel

Una de las aplicaciones más importantes del proceso sol-gel, es la producción de recubrimientos que pueden exhibir una amplia variedad de propiedades, por este proceso se pueden recubrir interior y exteriormente objetos con formas complejas.

La aplicación de los recubrimientos se logra a bajas temperaturas; aunque muchos de los casos son necesarios tratamientos térmicos con el propósito de densificarlos. Adicionalmente, los recubrimientos aplicados pueden prepararse con estructura cristalina o amorfa. Es posible encontrar aplicaciones para producir recubrimientos ópticos, protectivos o porosos

El proceso de formación de películas involucra los siguientes pasos: 1) Hidrólisis del precursor con formación de grupos terminales, 2) condensación por formación de uniones –M-O-M con pérdida de agua, 3) condensación cruzada con formación de polímeros o partículas submicrométricas, 4) gelificación con una formación de una estructura tridimensional, 5) deshidratación y densificación por calentamiento. Existen dos alternativas para el proceso de hidrólisis: a) hidrólisis controlada en medio alcohólico con cantidades estequiométricas o sub-estequiométricas de agua, que da lugar a la formación de polímeros orgánicos; b) hidrólisis con exceso de agua seguida de peptización en medio ácido, que da lugar a la formación de partículas submicrométricas (Segota *et al.*, 2011).

El tamaño de partícula y las características de las películas depende de las condiciones de síntesis del sol. Los soles poliméricos producen películas más compactas debidos a la interpenetración de las unidades poliméricas durante la gelificación y secado (Brinker y Scherrer, 1990).

1.5 Partículas nanométricas en un matriz polimérica

La introducción de partículas nanométricas en una matriz polimérica es una estrategia bastante utilizada para producir nuevos materiales híbridos con mejores propiedades eléctricas, térmicas, ópticas, mecánicas, reológicas y de barrera de gases.

Entre las cargas introducidas en los polímeros figuran principalmente las arcillas, silicatos, nanotubos de carbono y óxidos metálicos. Entre estos últimos podemos resaltar la utilidad del TiO_2 para impartir propiedades específicas, como filtros UV y buenas propiedades mecánicas. Desafortunadamente, el reforzamiento de polímeros hidrófobos como el polietileno, con nanopartículas de TiO_2 es difícil debido a la tendencia a la aglomeración. El alcohol polivinílico es un polímero biodegradable e hidrófilo, que tiene múltiples usos en la preparación de materiales plásticos, en la industria textil y en la industria farmacéutica. En esta última se emplea como excipiente, adhesivo, formador de películas y como matriz (Cabrera *et al* 2007).

Durante muchos años, el alcohol polivinílico (PVA) ha sido extensamente investigado por un gran número de técnicas para obtener una mejor comprensión de sus propiedades físicas y químicas. Debido a sus buenas propiedades formadoras de película, excelentes propiedades mecánicas, biocompatibilidad, baja toxicidad, flexibilidad, fácil preparación, excelente resistencia química, y su capacidad para ser reticulado sin ningún agente químico, el PVA se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, que incluyen el campo biomédico, sensores, la industria alimentaria, y las células de combustible, para nombrar algunos. Este polímero sintético se ha mezclado y químicamente modificado con un alto número de polímeros naturales y compuestos inorgánicos para aumentar o mejorar propiedades específicas, por ejemplo, la conductividad o propiedades mecánicas (González *et al.*, 2012).

El alcohol polivinílico (PVA) se ha usado ampliamente como una matriz para la preparación de nanocompuestos debido a su fácil manejo y alta claridad óptica. Se considera

entre los mejores polímeros como matriz huésped para partículas de óxidos metálicos, y se utiliza con frecuencia como un estabilizador por su claridad óptica, que permite la investigación de la formación de nanopartículas (González *et al.*, 2012).

1.6 Elemento de Reconocimiento Biológico

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de los biosensores es su alta selectividad, permitiendo diferenciar en algunos casos, incluso isómeros de una molécula. Esta particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en la aplicación como receptores en la fabricación de biosensores (González *et al.*, 2005).

Los biosensores, sobre todo los basados en transductores electroquímicos, son uno de los campos que más que más se ha investigado en los últimos años.

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

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

Los enzimas son los elementos más comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su bajo costo, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación.

Se han desarrollado gran cantidad de biosensores para la determinación de compuestos fenólicos, siendo los biosensores electroquímicos de tipo amperométrico los más utilizados (Sánchez-Paniagua, 2008).

La mayor parte de los biosensores amperométricos utilizan enzimas del grupo oxidoreductasas pues las especies consumidas o producidas durante el proceso de óxido-reducción, suelen ser fácilmente leídos por el transductor amperométrico (Cano, 2008).

Las enzimas polifenoloxidasas (PPO), son las enzimas más utilizadas para la determinación de estos compuestos, en las que se encuentra la enzima, lacasa, y la tirosinasa, metaloenzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y hongos (Chawla *et al.*, 2011).

Las polifenol oxidasas son metaloenzimas que contiene un 0.2 % de cobre. Para que la enzima actúe sobre un substrato fenólico, el Cu^{2+} da de encontrarse reducido a Cu^{+} , estado en el que la enzima puede ligar un oxígeno. El cobre situado en el centro activo del enzima, es esencial para la actividad de la polifenol oxidasas y su acomplejamiento da lugar a la inhibición de la misma. Bajo la denominación de polifenoxidasas, quedan comprendidas dos tipos de enzimas. El primer grupo lo constituyen las lacasa (E.C. 1.10.3.1) y el segundo tipo las lacasas (E.C. 1.10.3.2). Las primeras catalizan dos reacciones distintas:

- a) Reacción 1 o Actividad creolasa: hidroxilación de monofenoles en la posición orto para obtener o-difenoles.
- b) Reacción 2 Actividad catecolasa: oxidación de o-difenoles a sus correspondientes o-quinonas.

Estas dos reacciones enzimáticas consumen oxígeno y son conocidas en la literatura por el apelativo de actividad monofenolasa (o creolasa) y actividad o-difenolasa (o catecolasa).

Un segundo tipo de enzimas también denominadas polifenol oxidasas son las lacasas (E.C. 1.10.3.2), quienes tienen la peculiaridad de oxidar tanto o-difenoles como m- y p-fenoles a sus correspondientes quinonas con un pH óptimo entre 4 y 7.5 (Muñoz *et al.*, 2007). En la Figura 6 se presenta el esquema de reacción de las enzimas Lacasa y Tirosinasa.

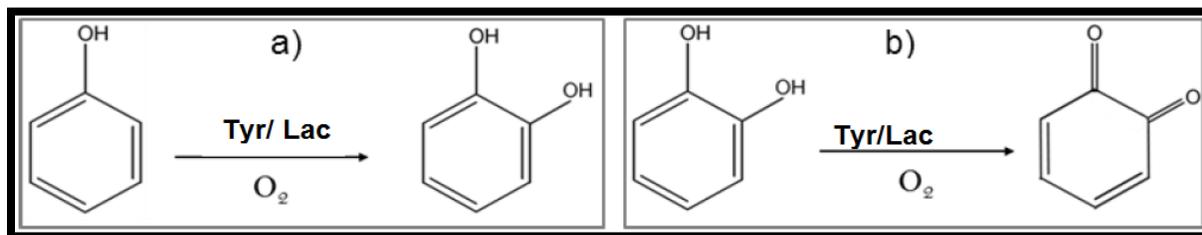


Figura 6. Esquema de reacción de las enzimas en la hidroxilación de monofenoles y la deshidrogenación de o-fenoles a o-quinonas.

1.7 Técnicas de Caracterización

A continuación se describen brevemente las diferentes técnicas de caracterización empleadas en este estudio; para el análisis químico, estructural, morfológico y electroquímico.

1.7.1 Difracción de Rayos X

La Difracción de rayos X (DRX) es una técnica muy usual para el análisis de materiales sólidos cristalinos o semicristalinos, ya que provee información variada tanto de su estructura como de su composición.

En 1912 se estableció de manera precisa la naturaleza de los rayos X., en ese año se descubrió la difracción de rayos x en cristales dicho descubrimiento probó su naturaleza y proporcionó un nuevo método para investigar la estructura de la materia de manera simultánea. La Difracción de rayos X es una radiación electromagnética de la misma naturaleza que la luz pero de longitud de onda mucho más corta. La unidad de medida en la región de los rayos X, es el angstrom (Å), igual a 10^{-10} m y los rayos x usados en difracción tienen longitudes de onda en el rango 0.5-2.5 Å mientras que la longitud de onda de la luz visible está en el orden de 6000 Å.

La difracción de rayos, está basada en la dispersión (Scattering) que consiste en que el fotón incidente es desviado en su dirección original de propagación con igual (dispersión elástica) o menor (dispersión inelástica) energía, por colisión con electrones. Cuando sobre un átomo incide un haz de rayos X puede considerarse, desde el punto de vista geométrico, que se comporta como un radiador puntual que se dispersa elásticamente (sin modificar su longitud de onda) la radiación en todas las direcciones del espacio.

Pero cuando el haz de rayos X se incide sobre un cristal, es decir, sobre una agrupación de átomos periódicamente ordenados en el espacio, entre las ondas dispersadas por cada uno de ellos se producen fenómenos de interferencia que, normalmente, en la mayor parte de las direcciones, serán de tipo destructivo, cancelándose la resultante en mayor o menor proporción. Sin embargo, en determinadas direcciones, y debido precisamente a la ordenación periódica de los átomos, puede ocurrir que las ondas dispersadas estén en fase y se esfuercen mutuamente. Este fenómeno de esfuerzo recibe en nombre de difracción (Albella *et al.*, 2000).

Las condiciones necesarias para que se produzca difracción vienen determinadas por la Ley de Bragg. Como en las sustancias cristalinas se pueden considerar distintas familias de planos paralelos y equidistantes entre sí. Consideremos una de estas familias con índices de Miller (hkl) y espacio d_{hkl} (ver Figura 7).

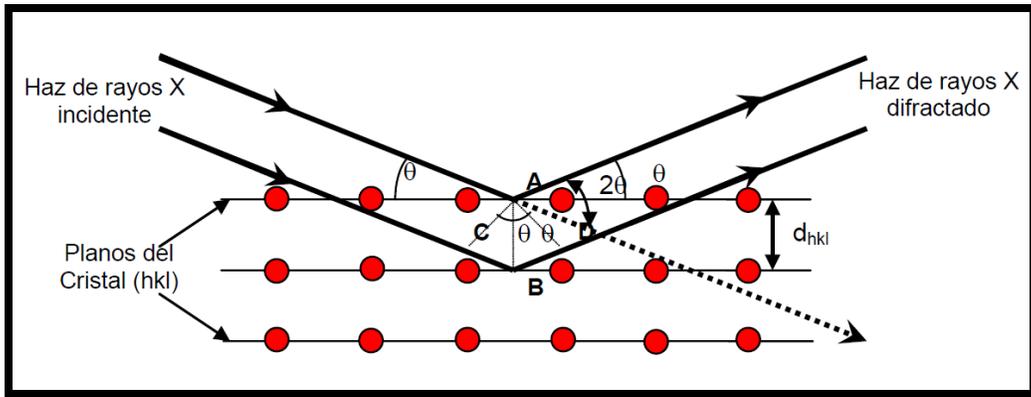


Figura 7. Difracción de los rayos X en los planos cristalinos de un sólido.

Si sobre estos planos incide un haz de rayos X monocromático, con longitud de onda λ (de algunos Å), en dirección que forma un ángulo θ con la superficie de los planos, solo se producirá refuerzo cuando el ángulo de incidencia, la longitud de onda de la radiación, el espacio de la familia de planos cumplan la siguiente relación, llamada Ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:

d = es la distancia interplanar correspondiente a la familia de planos de índices {hkl}.

λ = es la longitud de onda de los rayos X.

θ = es el ángulo de incidencia de la radiación.

n = representa un índice entero, conocido como el orden de la reflexión.

Asumiendo que los rayos incidentes con un ángulo θ son paralelos entre sí, es decir se encuentran en fase; la interferencia entre las dos ondas es constructiva cuando la diferencia de trayectoria entre las dos ondas (llamada Δt , la cual es la suma de las distancias CB Y BD), es igual al número entero (n) de longitudes de onda. Entonces si se analizan los triángulos formados ACB Y ABD obtenemos que

$\Delta t = CB + BD = 2d \sin \theta$, (Ecuación 5) que es lo que deduce la ley de Bragg.

La dirección en la que sale el haz difractado forma también un ángulo θ con la superficie de la familia de planos que difractan, es decir, un ángulo 2θ con la dirección de incidencia del haz de rayos X. Además, la dirección del haz y la dirección del haz difractado están contenidas en un plano que es perpendicular a la familia de planos, que difractan.

Como en un cristal hay distintas familias de planos, con distintos espacios, existirán también distintas direcciones de difracción. Al ser un conjunto de espacios en un cristal característico para cada especie cristalina, entonces no hay dos sustancias cristalinas que tengan todos sus espacios iguales, podemos decir, que no existen dos sustancias cristalinas que tengan un diagrama de difracción idéntico. Se dice que el diagrama de difracción es la huella dactilar de las sustancias cristalinas.

Esta técnica brinda una gran información sobre las estructuras cristalinas de los materiales, como las fases presentes, tamaño del cristalito, parámetro de red y distancia entre planos. Esto es posible ya que, algunas de las longitudes de onda de los rayos X son de la misma longitud de onda que la distancia interplanar de la red cristalina en cuestión (Cullity y Stock, 2001).

La Ley de Bragg conduce a líneas en el patrón de difracción, pero al realizar estos se observa que los picos corresponden a distribuciones gaussianas, cuyo ensanchamiento refleja la presencia de esfuerzos mecánicos debido a defectos y discontinuidades tales como bordes de grano, dislocaciones y fallas de apilamiento. Cualitativamente se puede tener una idea de dichos defectos a través de la medida del ancho medio del pico de difracción (FWHM), cuyo inverso (FWHM^{-1}) se utiliza como parámetro para establecer la calidad cristalina, teniendo en cuenta que entre mayor sea el FWHM^{-1} mayor será la calidad cristalina y por lo tanto las tensiones existentes en la red son menores (Figura 8).

En la Figura 8 se observa que la curva a) presenta mayor calidad cristalina debido a que el ancho del pico es menor que en los otros dos casos, que corresponden a la línea b y c, lo cual se traduce en un FWHM^{-1} mayor con respecto a los picos mostrados en b) y c).

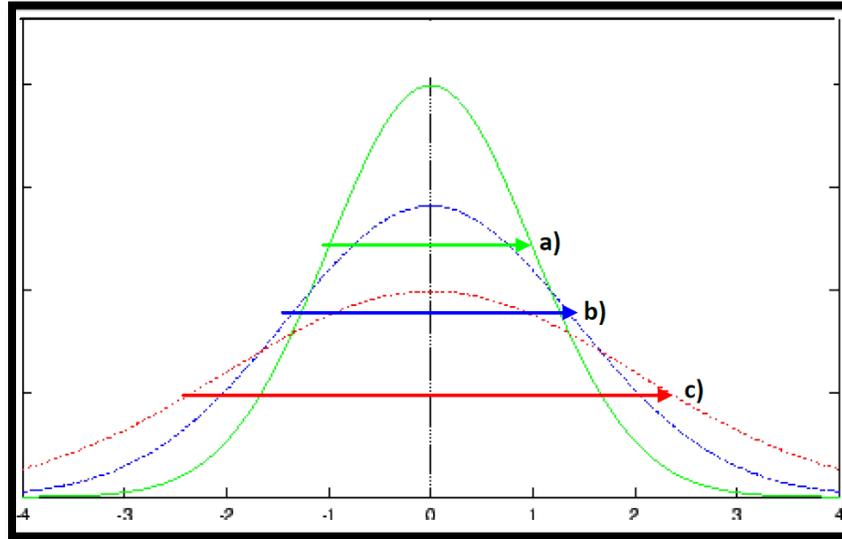


Figura 8. FWHM de los picos de difracción.

Ahora, la disposición de los picos de difracción, así como los espacios atómicos son medidos de forma precisa mediante DRX, lo que hace a esta la mejor técnica para caracterizar el tamaño de cristal mediante la ecuación de Scherrer:

$$d = \frac{0.9\lambda}{B \cos \theta} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

- d= Tamaño de cristal
- B= Ancho a la mitad del pico (rad)
- θ = Ancho a la altura media del pico (rad)
- λ = Longitud de Onda de los rayos X (0.154956 nm)

Como anteriormente se mencionó, la difracción de un material ocurre siempre y cuando se satisfaga la ley de Bragg (Ecuación 4) por lo que no cualquier dirección arbitraria necesariamente producirá difracción.

La Tabla 3 corresponde a las variables que pueden ser aplicadas para la obtención de los distintos modos de difracción.

Tabla 3. Métodos de Difracción de Rayos X.

Métodos	λ	θ
Laue	Variable	fijo
Cristal rotante	Fijo	Variable (en parte)
Polvos	Fijo	Variable

Como se muestra en la tabla anterior, las variables que pueden ser manejadas son la longitud de onda λ , o el ángulo θ , de modo que se pueden tener cuatro principales modos de difracción:

- El método de Laue.
- El método de cristal rotante.
- El método de polvos.
- El método de ángulo rasante.

El método de polvos puede ser aplicado para estudiar la estructura de las películas delgadas sobre un sustrato de características de difracción conocidas, pero aun la difracción para películas que son muy delgadas (con espesores menores a 100 Å) representa algunos problemas de detección, por lo que el método de polvos se utiliza en otra configuración en la cual se mantienen fijos la muestra y el haz incidente, pero con un haz a un ángulo muy pequeño (menor a 5°). Así que el que se mueve es el detector. Esto hace que el análisis a un ángulo más sensible a la superficie de la muestra y así conduce a mayor intensidad el haz difractado (que es el detectado), (Cullity y Stock, 2001).

1.7.2 Espectroscopía de Infrarrojo

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al haberlo sometido a la acción de la radiación infrarroja en el espectrofotómetro.

La región del espectro IR normal queda comprendida entre 2.5 μm y 15 μm , medido en unidades de longitud de onda, que corresponde a 4000 cm^{-1} y 666 cm^{-1} respectivamente.

La espectroscopía de IR mide los cambios vibracionales que experimentan las moléculas al absorber la energía electromagnética, estos cambios o movimientos pueden clasificarse en modos de estiramiento, donde la longitud del enlace cambia de una manera periódica durante la vibración; o modos de doblamiento, donde el ángulo entre los enlaces cambia de forma periódica durante las vibraciones (Hobart *et al.*, 1988)

Los modos de estiramiento se dividen a su vez en simétricos y asimétricos, por otra parte los modos de doblamiento se dividen en:

- Mecimiento: que ocurre cuando la mitad estructural se balancea en el plano de simetría de la molécula.
- Tijereteo: que es cuando los dos átomos unidos a un átomo central se alejan y acercan uno con respecto de otro, deformando el ángulo de valencia
- Alabeo: se presenta cuando la unidad estructural se balancea en el plano perpendicular al de simetría de la molécula.
- Torsión: se presenta cuando la unidad estructural gira en vaivén alrededor del enlace que la une con el resto de la molécula.
- Acoplamiento vibracional: Además de las vibraciones mencionadas, se puede dar el caso de una interacción entre ellas, si los enlaces vibrantes están unidos a un átomo central.

Los fotones de la radiación infrarroja son adecuados para excitar las moléculas a niveles superiores de vibración. Aunque las moléculas vibran con un todo, la mayoría de sus vibraciones

pueden asociarse a un tipo determinado de enlace, de modo que los espectros de infrarrojo proporcionan información sobre los grupos funcionales presentes en las moléculas.

Para que sea posible la absorción de la energía infrarroja por parte de una sustancia, es necesario que la energía que influye en ella, sea del mismo valor que la energía de vibración que poseen las moléculas de esa sustancia. Ya que en cada molécula existen diferentes átomos que forman distintos enlaces, en el espectro de infrarrojo aparecerán bandas de absorción a valores distintos de frecuencia y de longitud de onda.

El espectro de infrarrojo de un compuesto es una representación gráfica de los valores de onda (μm) o de frecuencia (cm^{-1}) ante los valores de porcentaje de transmitancia (T). La absorción de IR por un compuesto a una longitud de onda, origina un descenso en el porcentaje de transmitancia, lo que se pone de manifiesto en el espectro en forma de un pico o banda de absorción (Nakamoto 1997).

Para la obtención de los espectros de infrarrojos, se utilizan espectrofotómetros con interferómetros y transformada rápida de Fourier (FT-IR). La radiación de infrarrojo es analizada por medio de un interferómetro de Michelson, que consiste en un montaje óptico en el que se produce el fenómeno de interferencia de ondas electromagnéticas como se muestra en la Figura 9.

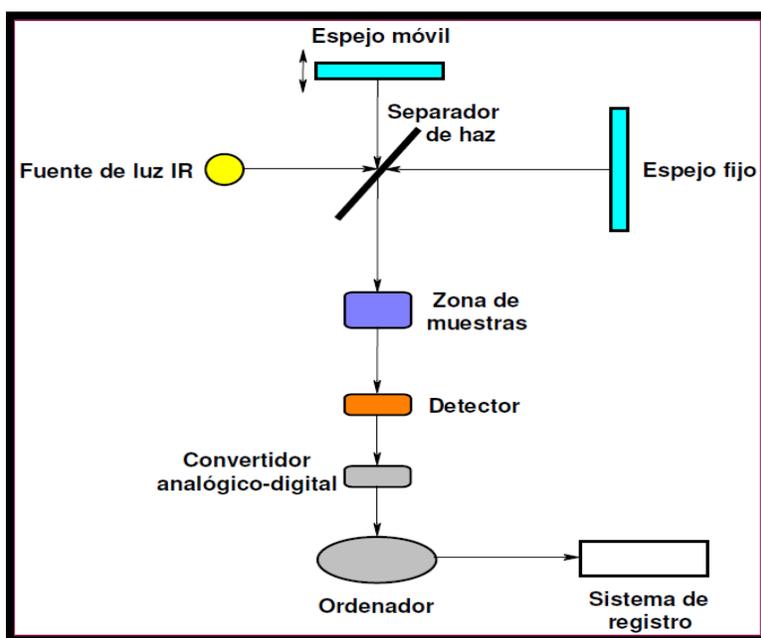


Figura 9. Interferómetro de Michelson.

En la operación del espectro de FT-IR, la radiación policromática de la fuente de infrarrojo (la cual consta de un filamento de Nerst) es colimada por un espejo y el haz resultante se divide en el espejo divisor; la mitad del haz pasa al espejo y la otra mitad se refleja en el espejo móvil. Después de reflejarse los dos haces, se recombinan nuevamente en el divisor del haz.

Cuando el espejo móvil está posicionado de tal manera que los dominios ópticos son iguales, simultáneamente todas las longitudes de onda de la luz proporcionan una interferencia constructiva. Si el espejo móvil se encuentra en alguna otra posición, una longitud de onda puede interferir constructiva o destructivamente, dependiendo si los haces de los caminos están o no en fase (Nakamoto, 1997).

1.7.3 Espectroscopía de Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Chandrasekhara Venkata Raman, en 1928, que le dio el premio nobel de Física en 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de dispersión de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares. Sus estudios sobre este fenómeno se inspiraron en los trabajos de Rayleigh.

El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desea determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial, resultado de la luz con la materia. La luz que tiene la misma frecuencia ν_0 que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias, $+\nu$, y $-\nu$ son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente.

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos analizados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen en el comportamiento dinámico de los enlaces existentes. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal se muestra en la Figura 10, donde las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.

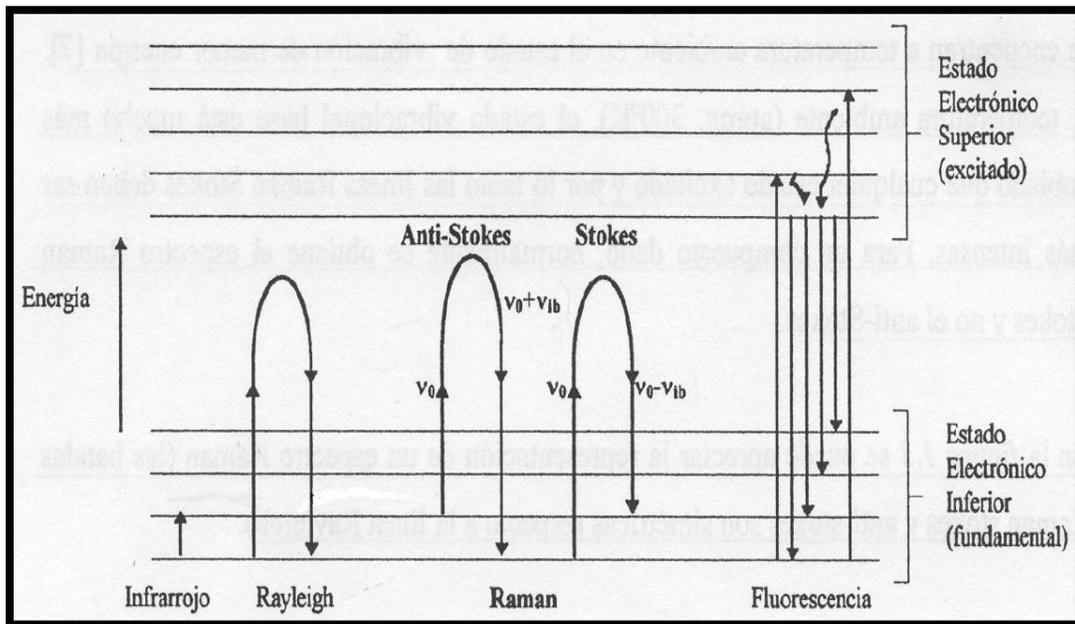


Figura 10. Diagrama energético de estados vibracionales y transiciones para diferentes interacciones luz-materia

Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Plank) mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales (o rotacionales) de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de un fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes). Esta dispersión puede ser interpretada como el proceso siguiente: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional (o rotacional) superior no permitido, el cual abandona

rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del sato energético realizado por la molécula.

Cada material tendrá unos valores de frecuencia de vibración característico de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda al que se produce (McCreery, 2000).

1.7.4 Microscopia Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrio (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, proporcionando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distinto tipo de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas.

Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.

La parte principal de un microscopio electrónico de barrido es la denominada columna de electrones la cual lleva alojados en su interior los siguientes elementos:

- Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación, por analogía con un sistema óptico.
- Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar y reducir a un diámetro muy pequeño el haz de electrones producido por el filamento.
- Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones ya focalizado por la superficie de la muestra.
- Uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
- Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que el conjunto funcione adecuadamente.

La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra.

La señal de electrones secundarios proporciona una imagen de la morfología superficial de la muestra. La señal de electrones retrodispersados una imagen cualitativa de zonas con distinto número atómico medio, y la señal de rayos X, espectros e imágenes acerca de la composición de elementos químicos en la muestra (Vázquez y Echeverría 2000). En la Figura 11 se muestra el esquema general de un microscopio electrónico de barrido.

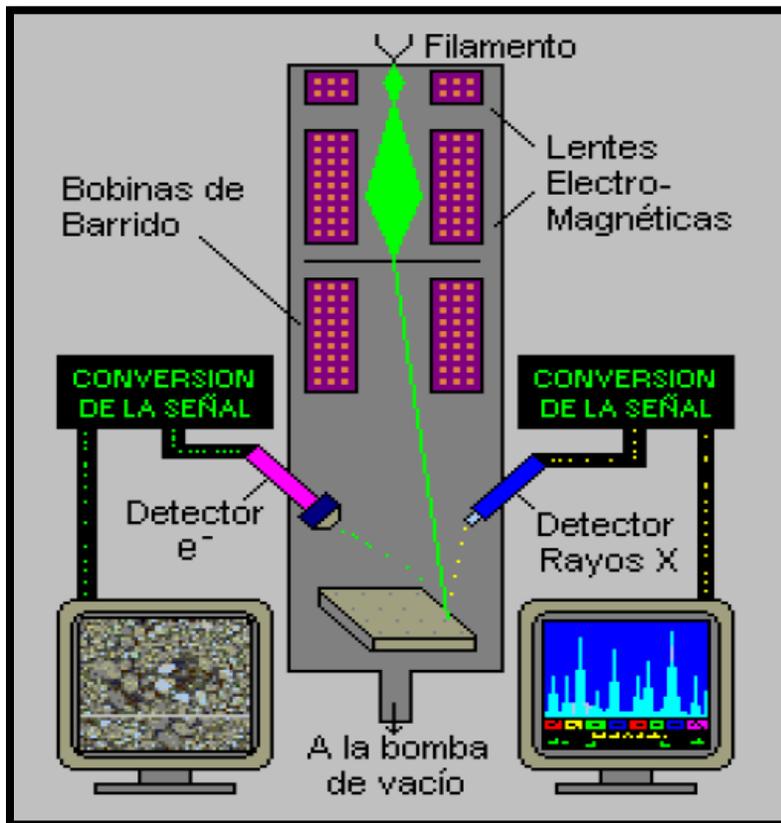


Figura 11. Esquema general de un microscopio de barrido.

1.7.5 Microscopia Electrónica de Transmisión

La microscopia Electrónica de transmisión (MET) es una técnica que permite realizar la observación de la muestra en cortes ultrafinos. Un microscopio de Transmisión dirige el haz de

electrones hacia la muestra; una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros la atraviesan. Estos últimos son denominados electrones transmitidos y son detectados por un sensor para formar una imagen aumentada de la muestra en una placa fotográfica o una pantalla fluorescente, colocada detrás de ella. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces asegurado a una adecuada resolución.

Un microscopio de transmisión es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitado por la longitud de onda de la luz visible. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. Las partes principales de un microscopio electrónico son:

- Cañón de electrones. Emite los electrones que chocan contra la muestra, creando una imagen aumentada.
- Lentes magnéticas. Crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones.
- Sistema de vacío. Debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire y se debe hacer un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.
- Placa fotográfica o pantalla fluorescente. Se coloca detrás de la muestra para registrar la imagen aumentada.
- Sistema de registro. Muestra la imagen que producen los electrones. Esta suele ser una computadora.

El MET emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros la atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces (Williams y Carter, 2009).

1.7.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

La técnica de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés), es un método electroquímico utilizado en estudios de corrosión, el cual se basa en el uso

de una señal de corriente alterna (CA) que es aplicada a un electrodo (metal de corrosión) y determinando la corriente de la respuesta correspondiente.

El procedimiento experimental más comúnmente usado, se basa en aplicar una pequeña señal de potencial (E) a un electrodo y se mide su respuesta en una corriente (I) a diferentes frecuencias. No obstante, en ciertas circunstancias, es posible aplicar una señal pequeña de corriente y medir la respuesta en el potencial del sistema. Así, el equipo electrónico usado procesa las mediciones de potencial- tiempo y corriente- tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada. En esta relación de valores de impedancia y frecuencia se denomina “espectro de impedancias” (Bard y Faulkner, 2001).

En el caso de los estudios de corrosión que utilizan la técnica de EIS, los espectros de impedancia obtenidos suelen ser analizados mediante circuitos eléctricos, compuestos por componentes tales como resistencias (R), capacitancias (C), inductancias (L), etc. Combinados de tal manera que produzcan los espectros de impedancias medidos. Estos circuitos eléctricos son denominados “circuitos eléctricos equivalentes”.

La impedancia es un término que describe la resistencia eléctrica (R), utilizados en circuitos de corriente alterna (CA). En un circuito de corriente directa (CD) la relación entre la corriente (I) y el potencial (E) están dada por la ley de Ohm.

$$E = IR \text{ (Ecuación 7).}$$

Dónde:

E.- potencial (Volts),

I.- corriente (Ampers)

R.- resistencia (Ohms)

. En el caso de una señal alterna la expresión equivalente es la siguiente:

$$E = IZ \text{ (Ecuación 8).}$$

Z representa la impedancia del circuito, en unidades de ohm. La impedancia de un circuito de CA depende de la frecuencia de la señal aplicada. La frecuencia (f) de un sistema de CA se expresa en unidades hertz (Hz) o número de ciclos por segundo (s^{-1}).

De esta manera, es posible definir la admitancia (Y) de un circuito de CA. La admitancia es el recíproco de la impedancia y es un parámetro de importancia en los cálculos matemáticos que involucra la técnica y por otra parte, los equipos usados en estudios de EIS miden en realidad la admitancia.

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{I}{E} \quad (\text{Ecuación 9}).$$

La impedancia de un sistema a cada frecuencia está definida por la razón entre la amplitud de la señal de corriente alterna y la amplitud de la señal de potencial alterno y el ángulo de fase. Un listado de estos parámetros a diferentes frecuencias constituye el “espectro de impedancia”. El desarrollo matemático de la teoría que fundamenta la técnica de EIS permite describir la impedancia de un sistema en términos de un componente real y un componente imaginario (asociado a la raíz cuadrada de -1), (Adrezej, 1999).

1.7.7 Presentación de los Datos de Impedancia

Los datos obtenidos en los ensayos de espectroscopía de impedancia electroquímica, son los reportados por los equipos comerciales en una de las dos formas:

- a) Módulo de la impedancia ($|Z|$) y ángulo de fase (ϕ).
- b) Componente real de la impedancia total (Z') y componente imaginaria de la impedancia total (Z'').

Estos dos métodos de describir la impedancia son la base para presentar los datos, denominados diagramas de Nyquist y de Bode.

El módulo de la impedancia $|Z|$, el ángulo de fase (ϕ) y los componentes real e imaginario de la impedancia total, se relacionan entre sí de acuerdo a las siguientes expresiones (Genesca, 2002).

$$|Z|^2 = Z'^2 + Z''^2 \quad (\text{Ecuación 10}).$$

$$\tan \phi = Z''/Z' \text{ (Ecuación 11).}$$

$$Z' = |Z| \cos \phi \text{ (Ecuación 12).}$$

$$Z'' = |Z| \sin \phi \text{ (Ecuación 13).}$$

Gráfico de Nyquist

Este tipo de gráfico, también conocido como gráfico de plano complejo (se grafica Z' contra Z''), permite identificar diferentes parámetros obtenidos en el ensayo de espectroscopía de impedancias, en la Figura 11 se muestra este tipo de gráfico; por ejemplo se puede obtener la R_p (la resistencia a la transferencia de carga del material estudiado) C (capacitancia) y la R_s (la resistencia eléctrica del medio de trabajo o de la solución). A partir de dichos parámetros, es posible realizar comparaciones y estimaciones del comportamiento frente a la corrosión del material en estudio. En la Figura 12 muestra el comportamiento de Impedancia total (Z) correspondiente a un circuito en paralelo de la resistencia (R), capacitancia (C) a diferentes frecuencias (Hz), ($R=10 \text{ ohm}$, $C= 0.0001 \text{ Fcm}^{-2}$, frecuencia máxima=105 HZ y mínima= 10^{-2} Hz) y la frecuencia aumenta de derecha a izquierda.

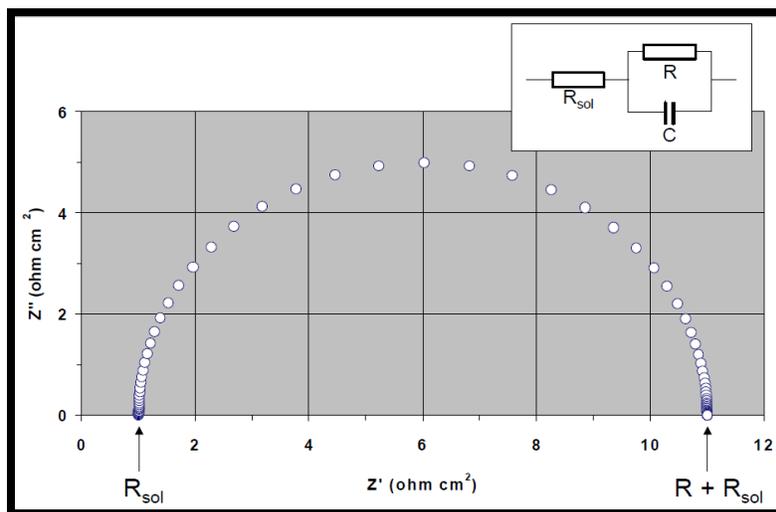


Figura 12. Componentes en el Diagrama de Nyquist de la Impedancia Z.

Gráficos de Bode

Los gráficos de Bode son representaciones de diferentes parámetros de la impedancia contra la frecuencia y existen diferentes variantes. Los más comunes son:

- Logaritmo base 10 del módulo de la impedancia ($|Z|$) contra logaritmo base 10 de la frecuencia (f).
- Ángulo de fase (ϕ) contra logaritmo base 10 de la frecuencia (f).

A diferencia de los gráficos de Nyquist, las representaciones de Bode Figura 13 contienen toda la información de un ensayo de EIS, ya que las frecuencias se identifican claramente, permitiendo conocer la impedancia de la transferencia tanto del material como del medio de trabajo.

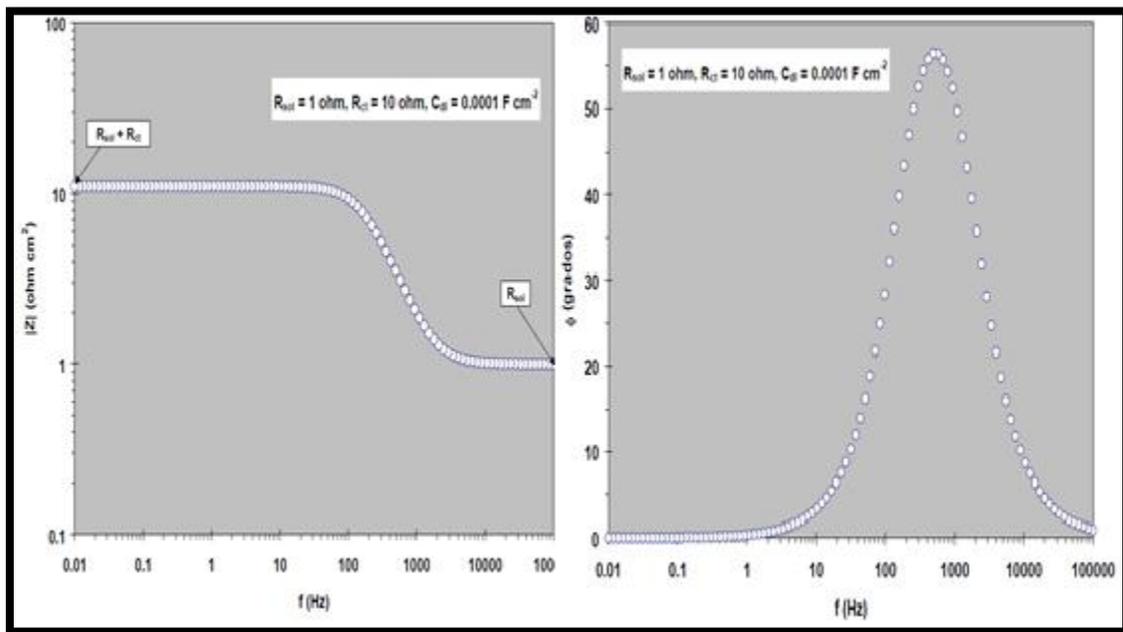


Figura 13. Diagramas de Bode $|Z|$ y diagrama de ángulo de fase para la Figura 11.

2 JUSTIFICACIÓN

Ante la necesidad de crear nuevos materiales para usos avanzados ha llevado al desarrollo de nuevas alternativas en el diseño, proceso y fabricación de una gran variedad de materiales. El desarrollo de materiales nanocristalinos con características mejoradas actualmente es de estudio.

Dentro de estas áreas de investigación está la generación de recubrimientos que confieran al material un incremento de las propiedades físicas, químicas y mecánicas. La técnica sol-gel es ampliamente aplicada a la fabricación de productos cerámicos con propiedades mejoradas. La aplicación de recubrimientos, utilizando esta técnica permite alargar la vida útil o extender el límite de uso de los materiales, manteniendo sus propiedades básicas, ya que los recubrimientos pueden actuar como barreras térmicas y modificar las propiedades del material base, por ejemplo disminuyendo la fricción entre superficies en contacto, degradación etc. Una de las aplicaciones de dichos recubrimientos es la de actuar como barrera anticorrosiva, reduciendo así el contacto de la superficie con el medio ambiente y aumentando con ello la capacidad de utilización del material mediante el aporte de nuevas propiedades a la superficie.

3 HIPÓTESIS

Es posible obtener recubrimientos de TiO₂-PVA, dispersados por ultrasonido con superficie nanoestructurada, manteniendo la estructura cristalina deseable y mejorando la adhesión al sustrato, para ser aplicadas como matriz en la inmovilización de biomoléculas.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Emplear el proceso Sol-gel para la síntesis del TiO_2 para la obtención de recubrimientos en sustratos de grafito: con mezclas de TiO_2 y el polímero polivinil-alcohol por simple deposición en goteo en la superficie de grafito para su aplicación en la construcción de biosensores.

4.2 Específicos

1. Sintetizar el TiO_2 por el método sol-gel y caracterizar estructural y morfológicamente.
2. Determinar la relación optima TiO_2 -PVA para la obtención de los recubrimientos.
3. Realizar recubrimientos de TiO_2 -PVA en electrodos de grafito y caracterizar morfológicamente.
4. Analizar los recubrimientos de TiO_2 -PVA por Impedancia Electroquímica (EIS).

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

- Tetrabutóxido de Titanio, 97% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Isopropóxido de Titanio, 97% de pureza (Sigma-Aldrich).
- Acetilacetona, 99% de pureza (Sigma-Aldrich).
- H₂O desionizada.
- Alcohol polivinílico (PVA).
- Cloruro de Potasio (KCl)
- Ferricianuro de Potasio, K₃Fe(CN)₆, 99.99% de pureza.
- Barras de Grafito.

Para el pulido del electrodo se utilizó:

- Ácido Nítrico, (HNO₃), 65.2% de pureza (Sigma- Aldrich).
- Hidróxido de Amonio (NH₄OH), 28% NH₃ (Reasol)
- Ácido Ascórbico,
- Alúmina polvo.
- Acetona
- Etanol 99.5 % de pureza (J. Baker).

5.2 Equipo

Especificaciones técnicas del equipo utilizado:

- Equipo ultrasónico ULTRASONIK™, Ultrasonic Cleaner, Modelo 19H, 120V, 50/60Hz, 115W.
- Parrilla de agitación, Barnstead International CIMAREC, modelo No. SP 131325, 120V, 8.90A, 60Hz.

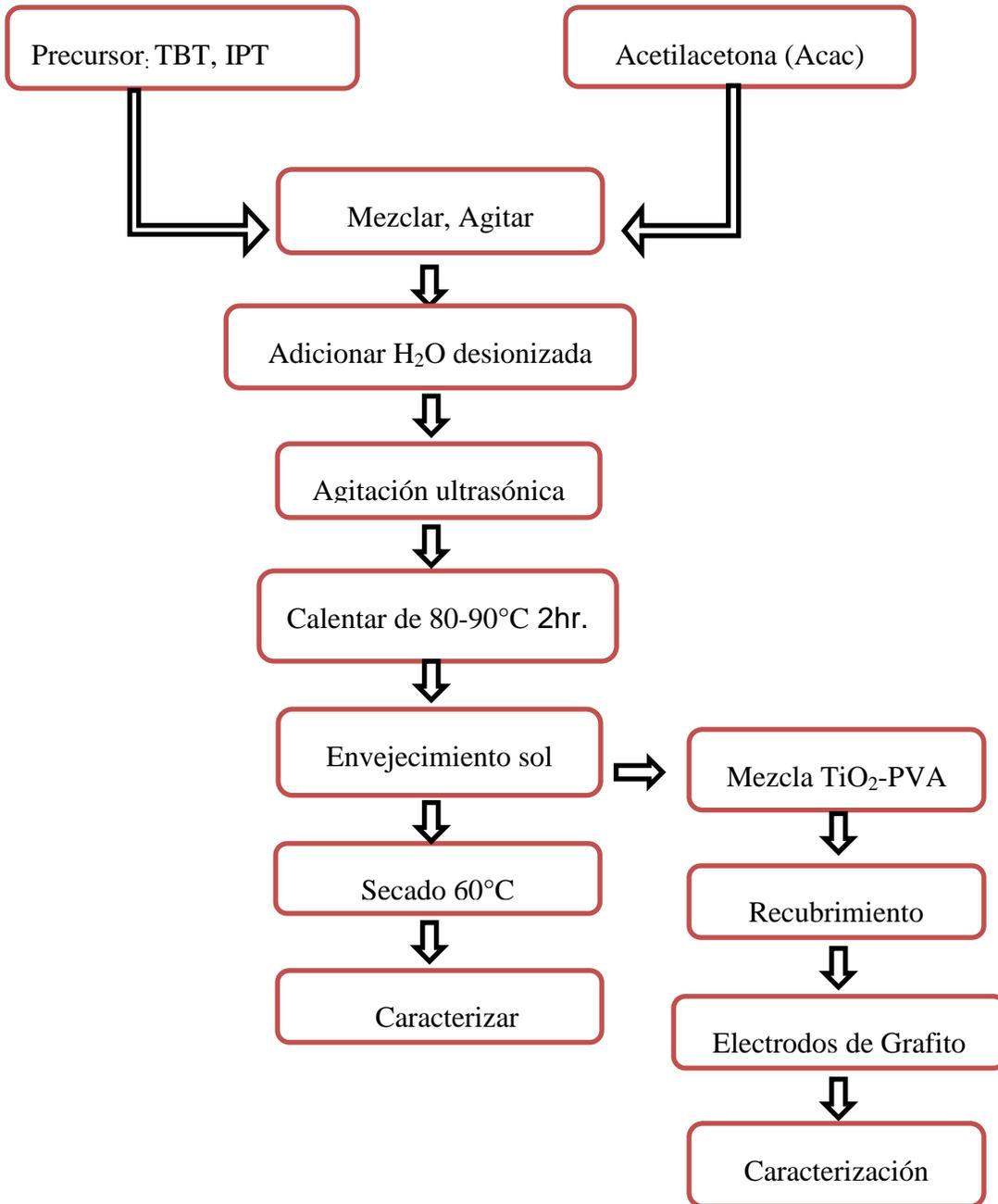
- Horno de secado, ECOSHEL, modelo 9023^a, RT+/- 10-250°C, estabilidad de temperatura 0.1°C +/- 1°C
- Cortadora de baja velocidad modelo Buehler, acoplada con un disco de filo de diamante 60-200-90.

El equipo utilizado para la caracterización de TiO₂ fue el siguiente.

- Difractómetro de Rayos X modelo D8 Advanced, marca Bruker, con una longitud de onda característica de $\lambda=0.15405$ nm y con una radiación Cu K α a 20 Kv y 20 mA. Las condiciones de operación fueron a una velocidad de 2° min⁻¹ El intervalo del ángulo seleccionado fue en escala $2\theta = 10$ a 80°.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo marca Nicolet, modelo 205-FT-IR, usando KBr para dispersar la muestra y formar la pastilla.
- Espectrofotómetro Raman Dispersivo marca Dilor Lampram, temperatura de 21°C, humedad relativa de 37%, potencia de 20 Mw, tiempo de integración de 120 segundos, Laser de HeN con un haz de 632.8 nm.
- Microscopio Electrónico de Barrido, marca JEOL, modelo JSM-6400 con detector de rayos X marca Bruker de 133 Ev.
- Microscopio Electrónico de Transmisión, marca JEOL, modelo 2010F, el cual funciona con un cañón electrónico de emisión de campo (FEG).
- Potenciostato marca, Gamry Reference 600TM, con un software Gamry Framework versión 5.5, para realizar los ensayos electroquímicos y un software para el análisis de datos, Gamry Echem Analyst versión 5.5.

5.3 Síntesis de TiO₂

La síntesis de TiO₂ se obtuvo por el método de sol-gel.



5.4 Formación de películas en la base de los electrodos de grafito

Las barras de grafito fueron cortadas y caracterizadas estructural y morfológicamente.

5.4.1 Tratamiento de Pulido

Pulido de los electrodos de grafito (Método de Kochana *et al.*, 2008).

- 1.- Con papel de lija de diferente rugosidad (400, 600 y 1000).
- 2.- Al_2O_3 de 0.5 μm
- 3.- Lavar con H_2O desionizada por 10 min en baño ultrasónico.
- 4.- Ultrasonido 5 minutos con las siguientes soluciones:
 - Ácido Nítrico 1:1 ($\text{H}_2\text{O}:\text{HNO}_3$)
 - Solución acuosa de Amonio
 - Solución Saturada de Ácido ascórbico
 - Acetona
- 5.- Lavar con H_2O desionizada.
- 6.- Secar en Horno a 60°C 30 min.

5.4.2 Recubrimiento TiO_2 -PVA en electrodos de grafito

Se preparó una solución de PVA al 2%.

El sol de Titania sintetizado se mezcló con el PVA en dispersión ultrasónica por 10 minutos, en las relaciones 1:3, 1:2, 1:1 de TiO_2 -PVA.

Posteriormente la mezcla TiO_2 -PVA fue esparcida en la base del electrodo de grafito pre-tratado (Ting *et al.*, 2003; Kochana *et al.*, 2008).

- 1.- Se tomaron 25 μl de la mezcla TiO_2 - PVA en la relación 1:3, 1:2, 1:1.
- 2.- Depositaron directamente en la base del sustrato (grafito).
- 3.- Secar a Temperatura ambiente.
- 4.- Caracterizar estructural y morfológicamente.

Para el análisis de Impedancia electroquímica, los electrodos fueron recubiertos con silicón para garantizar que el análisis solo se realizará en el recubrimiento.

5.4.3 Caracterización por Impedancia Electroquímica

Se realizaron medidas de Impedancia (EIS) a temperatura ambiente, empleando un celda electroquímica compuesta por un sistema de tres electrodos, un electrodo de referencia Ag/AgCl saturado de calomenos (ESC), un alambre de platino como contraelectrodo (CE) y un electrodo de Trabajo (ET), que es el electrodo a analizar, los cuales fueron sumergidos en Solución $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en Buffer de Fosfatos a pH de 6 y en solución de KCl 0.1 M. Los espectros impedancia se obtuvieron haciendo barridos de frecuencia en el rango de 10^5 Hertz (Hz) a 0.01 Hz y empleando una amplitud de señal sinusoidal de 10 mV y en Potencial de Circuito abierto (PCA).

Los espectros de Impedancia fueron ajustados a un circuito eléctrico equivalente, con ayuda del programa Z-View versión 2.0.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se analizaron los resultados del TiO_2 obtenidos por el proceso sol-gel, tanto de los polvos de TiO_2 y mezcla de TiO_2 -PVA; así como los recubrimientos de TiO_2 -PVA sobre grafito, las técnicas utilizadas fueron: DRX, IR, Raman, MEB, MET y la técnica de EIS para la caracterización electroquímica de los recubrimientos.

6.1 Análisis estructural y morfológico del grafito

En la Figura 14 se observa el difractograma del grafito en forma de barra, que fue el material empleado como sustrato, presentándose en el ángulo 2θ los picos: 26.5° , 42.3° , 44.5° , 50.70° , 54.66° , 59.89° , 77.49° , 83.61° y 100.128° , los cuales coinciden con el patrón de difracción 00-056-0159 correspondiente al grafito.

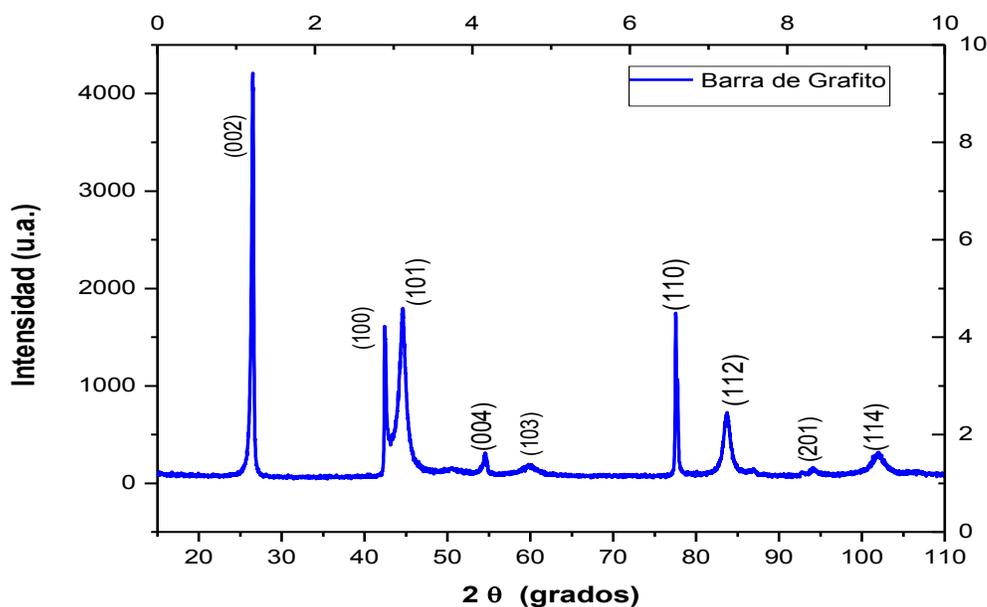


Figura 14. Espectro de difracción de Rayos X del grafito.

En la Figura 15 se observan las micrografías de MEB de las barras de grafito, en las que se observa una superficie rugosa y con elevada porosidad.

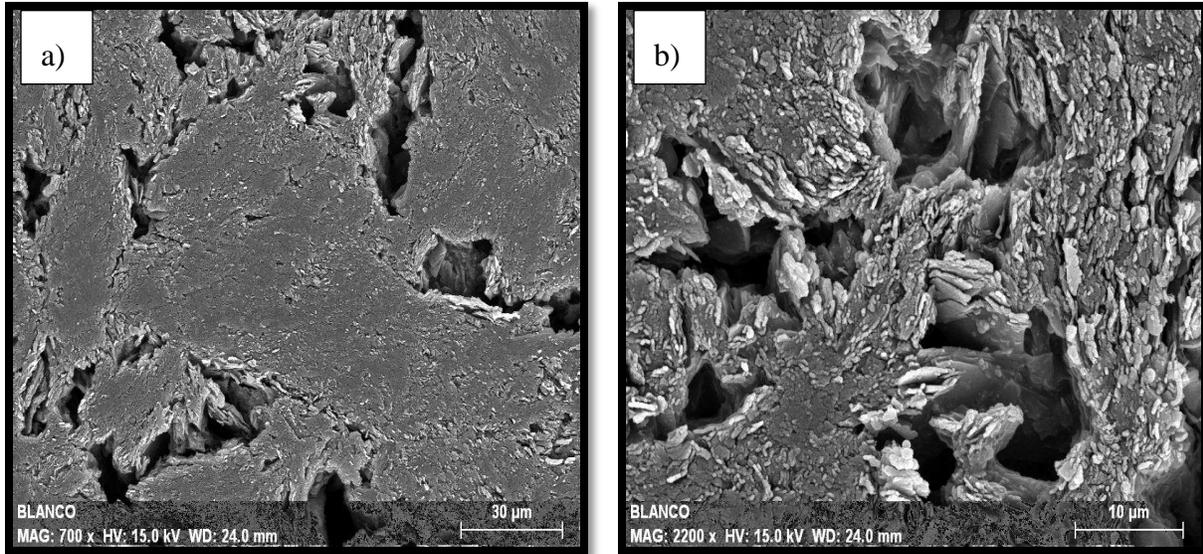


Figura 15. Micrografías de grafito en barra a) 700X, b) 2200X

6.2 Caracterización de TiO_2

En la Figura 16 se muestra el espectro de difracción de Rayos-X del TiO_2 sintetizado y secado a 60°C , en el que se presentan los picos de difracción en el ángulo 2θ : 25.4° , 38.1° , 48.2° , 54.2° , 62.4° , 69.4° , 75.5° , característicos de la fase cristalina anatasa de acuerdo al patrón de difracción de Rayos-X 00-070-6826.

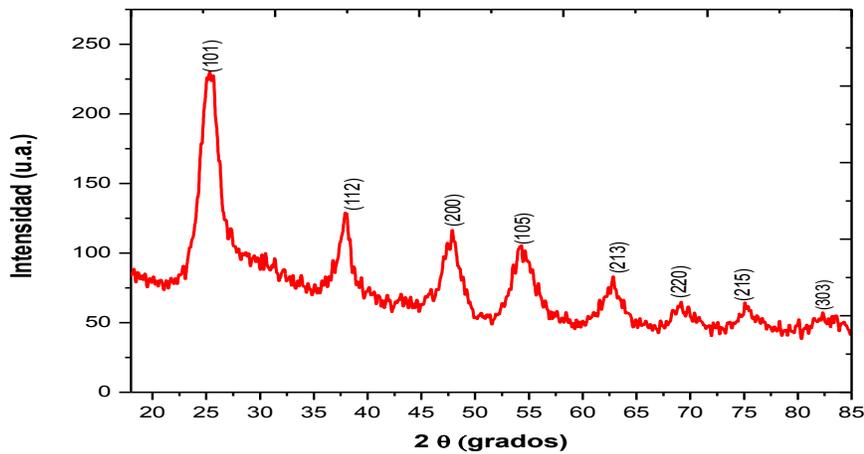


Figura 16. Espectro de Difracción de Rayos x de TiO_2 secado a 60°C .

Utilizando la ecuación de Scherrer se obtuvo el tamaño de cristal del TiO_2 en polvo, tomando como referencia el pico de mayor intensidad, plano (101) obteniendo un tamaño promedio del cristal de: $D= 8.43 \text{ nm}$

En la Figura 17 se presentan el espectro de infrarrojo para la muestra de TiO_2 en polvo, observándose las bandas alrededor de 650 y 770 cm^{-1} y que corresponden al modo de vibración del grupo funcional de Ti-O-Ti (Chen *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011), las bandas de 1032 , 1120 y 1185 cm^{-1} están asociadas al modo vibracional del grupo funcional γ (Ti-O-C) (Guzmán *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2011), las bandas ubicada en 1284 y 1360 cm^{-1} se asocian grupos remanentes acetilacetato de la reacción con el precursor (Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008), (Guzmán *et al.*, 2007; Arredondo *et al.*, 2011), la banda de 1430 cm^{-1} se puede asociar al modo de vibración de los grupos orgánicos C-H residuales (Vargas *et al.*, 2011), mientras que las bandas ubicadas en 1524 y 1568 cm^{-1} se pueden asociar a grupos del acetilacetona (Acac) enlazados al titanio, concretamente a los modos ν (C-O) y (C-C); y al modo vibracional (Ti-O-Acac), (Chen *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008), la banda de 1623 cm^{-1} corresponde al modo de flexión del enlace O-H (Vargas *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2008; Zubieta *et al.*, 2012) y finalmente la banda alrededor 3320 cm^{-1} corresponde al modo vibracional de tensión del H-OH (Chen *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Zubieta *et al.*, 2012).

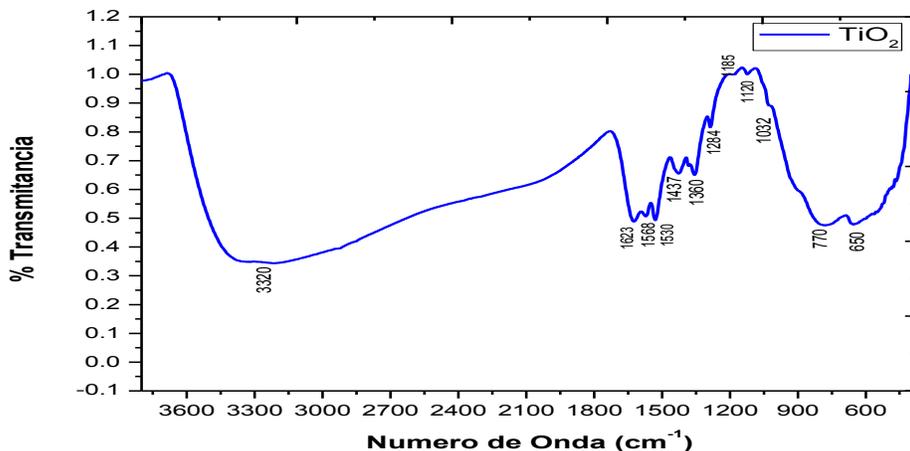


Figura 17. Espectro de IR de TiO_2 .

En la Figura 18 se muestra el espectro de Raman, que confirma la formación de TiO_2 en fase anatasa, presentándose las bandas características ($144, 398, 519$ y 640 cm^{-1}) coincidiendo con lo reportado (Pottier *et al.*, 2003; Chen y Mao, 2007)

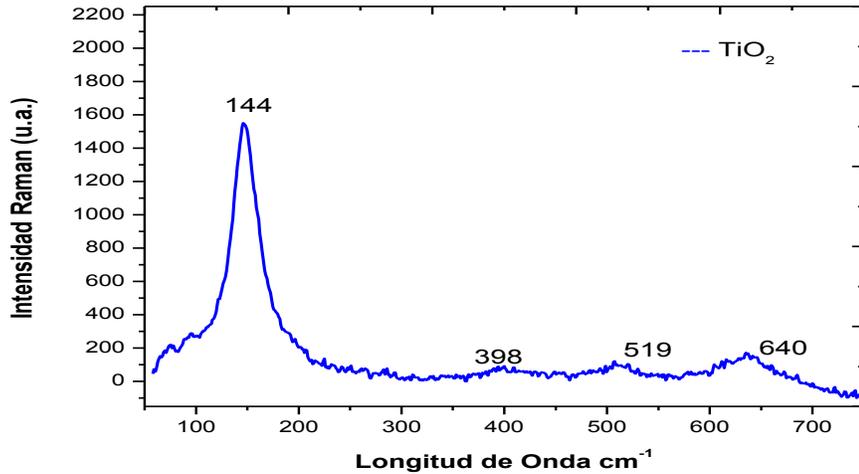


Figura 18. Espectro de Raman de TiO_2 secado a 60°C .

En la Figura 19 se muestran las imágenes de MEB de TiO_2 secado a 60°C , observándose partículas esféricas del orden de 1300 a 150 nm .

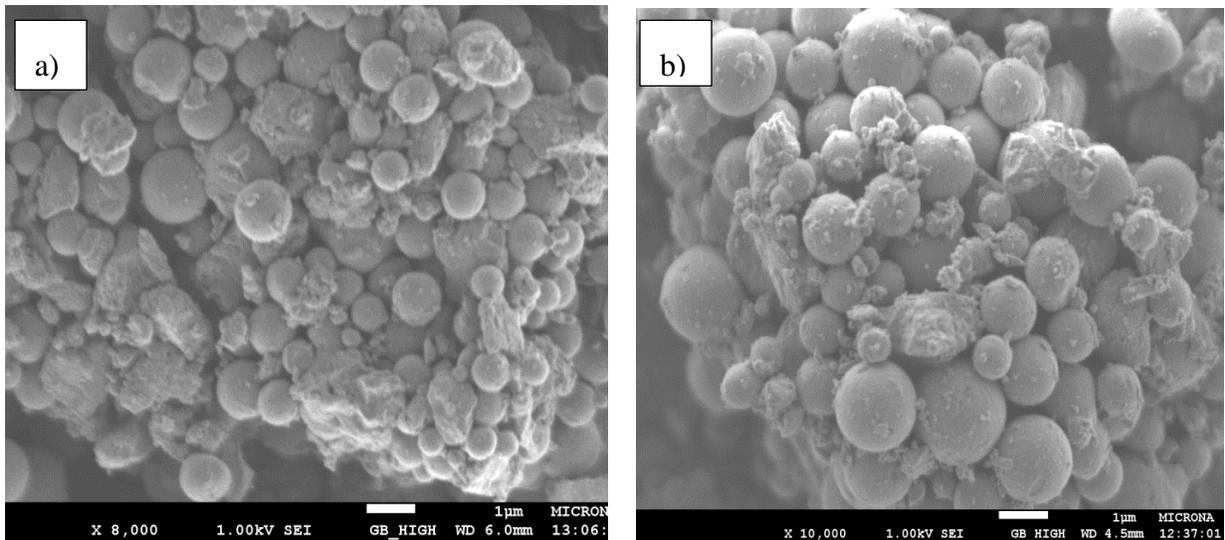


Figura 19. Micrografía de TiO_2 en polvo a) $8000\times$, b) $10,000\times$.

En la Figura 20 se muestra la imagen de MET del TiO₂ sintetizado, presentando una morfología, en su mayoría partículas esféricas con una distribución de tamaño ≤ 1300 nm, lo cual se corrobora con el análisis de microscopia de barrido.

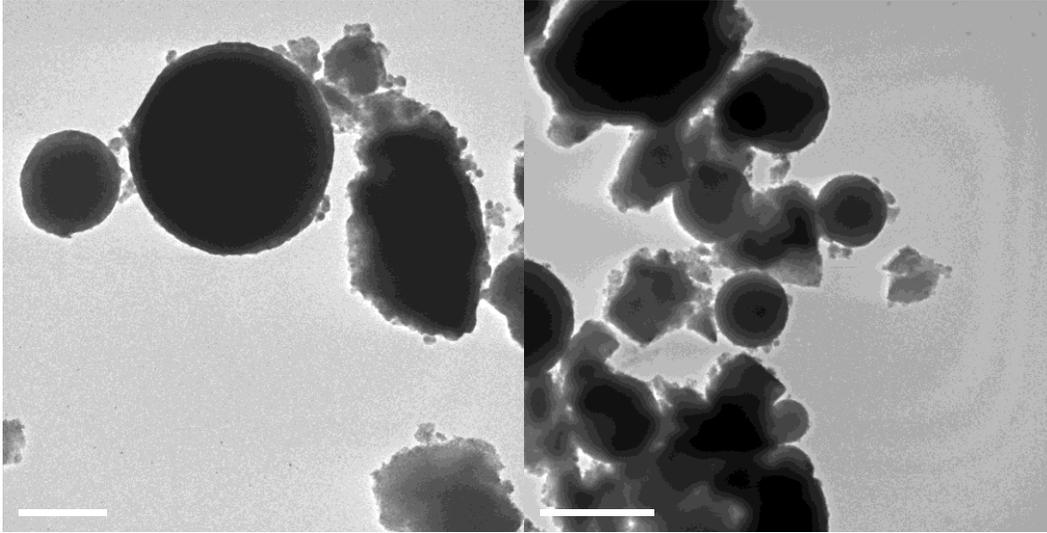


Figura 20. Micrografía de MET de TiO₂ en polvo.

La Figura 21 corresponde a la micrografía de MET de alta resolución, por medio de la cual también se logró determinar la fase cristalina del TiO₂ sintetizado, mediante la medición de las distancias interplanares de los arreglos atómicos del TiO₂. La distancia promedio fue de 3.52 Å, misma que se asoció con las distancias reportadas en el patrón de difracción Rayos-X 00-021-1272, distancias que corresponden a los planos (101) en ángulo $2\theta = 24.4^\circ$ siendo este el pico mayor intensidad y característico del dióxido de titanio para la fase cristalina anatasa.

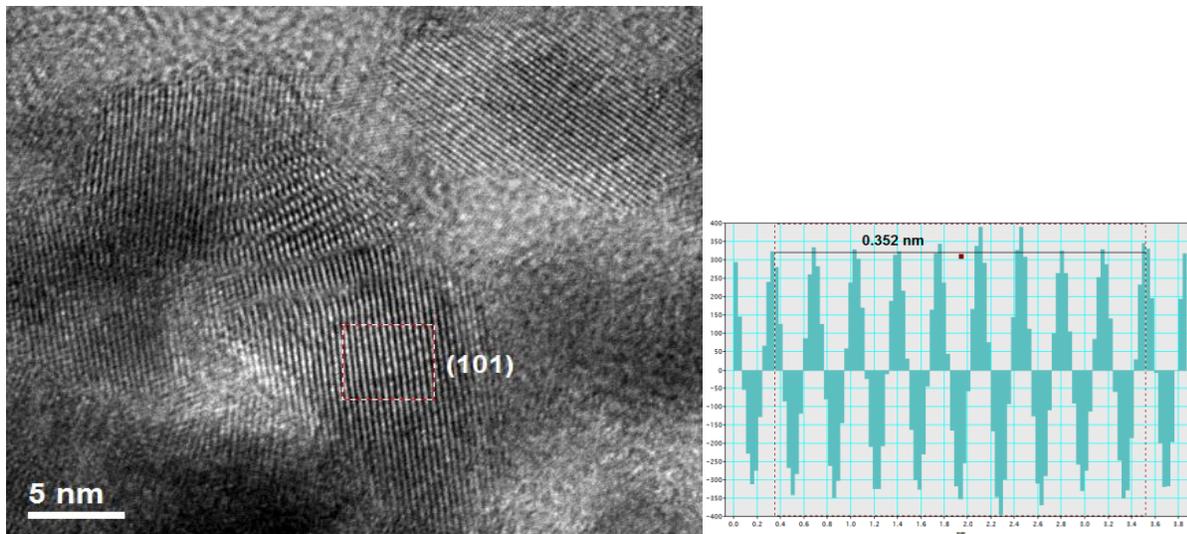


Figura 21. Micrografía MET de alta resolución TiO₂ en polvo.

6.2.1 Polvos de TiO₂-PVA

En la Figura 22 se muestra el difractograma de las mezclas Dióxido Titanio con el polímero polivinil-alcohol, que fue el polímero adicionado para lograr una completa adhesión al sustrato (barra de grafito). El polímero se adicionó en la relación de TiO₂-PVA, 1:1, 1:2 1:3 respectivamente, presentándose en la Figura 20 a), b) y c), en el ángulo 2θ los picos de difracción: 25.4°, 38.1°, 48.2°, 54.2°, 62.4°, 69.4°, 75.5°, característicos del TiO₂ en fase cristalina anatasa de acuerdo al patrón de difracción de Rayos-X, 00-070-6826, así mismo en la Figura 20 b) y c) se presenta en el ángulo 2θ un pico inicial de 19.3°, característico del polímero polivinil-alcohol para el Patrón de difracción de Rayos-X 00-053-1847 (Mallakpour y Barati, 2011), pico que solo es evidente en la relación 1:2 y 1:3, que es debido a la mayor relación del polímero con respecto al TiO₂.

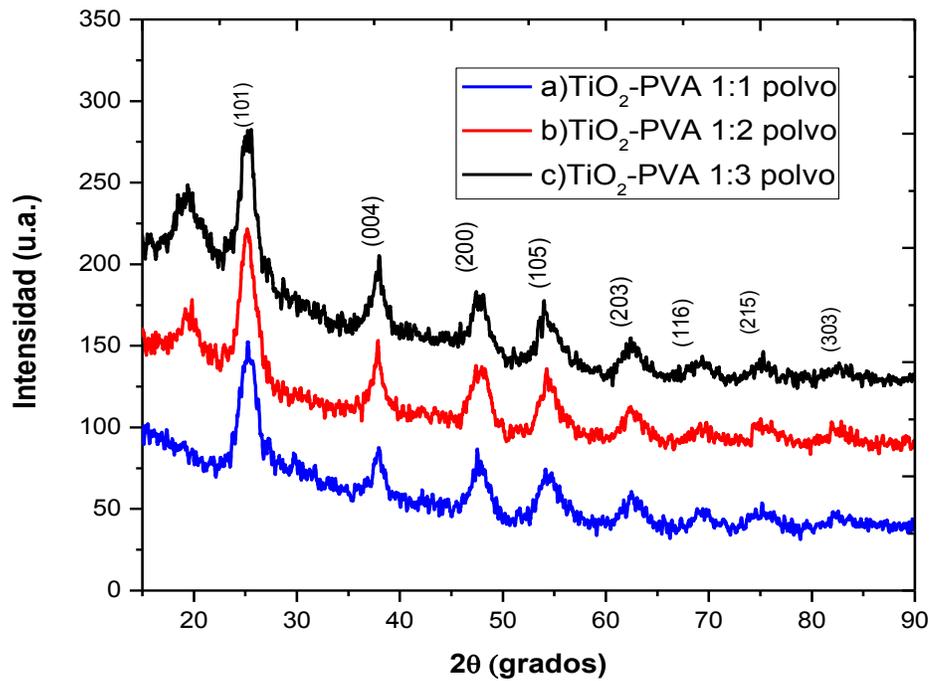


Figura 22. Espectros Difracción de Rayos X de las mezclas TiO₂: PVA.

En la Tabla 4 se muestran los resultados del tamaño de cristal de las tres muestras de las mezclas de TiO₂-PVA, empleando la ecuación de Scherrer y tomando como pico representativo el correspondiente al plano (101).

Tabla 4. Tamaño de cristal calculado por la ecuación de Scherrer.

Muestra	λ nanómetros (nm)	Ancho de pico a la altura media en radianes	Angulo del pico en radianes 2θ	Tamaño de cristal (nm)
TiO ₂ -PVA 1:1	0.54956	0.0167	0.2188	8.48
TiO ₂ -PVA 1:2	0.54956	0.0175	0.3037	7.555
TiO ₂ -PVA 1:3	0.54956	0.0175	0.2217	7.710

En el espectro de la Figura 23 se muestran el Espectros de Infrarrojo del TiO_2 -PVA 1:1 presentándose bandas intervalo de $400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, región que es relacionada a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C, (Mallakpour y Barati, 2011; Vargas *et al.*, 2011), también se presentan la banda 1366 cm^{-1} que se asocian grupos remanentes acetilacetato de la reacción con el precursor (Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008), (Guzmán *et al.*, 2007; Arredondo *et al.*, 2011), la banda de 1128 cm^{-1} asociada al modo de vibración de los grupos orgánicos C-H residuales (Vargas *et al.*, 2011), mientras que las bandas ubicadas en 1526 y 1578 cm^{-1} se pueden asociar a grupos del acetilacetona (Acac) enlazados al titanio, concretamente a los modos $\nu(\text{C-O})$ y (C-C) ; y al modo vibracional (Ti-O-Acac), (Chen *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008), la banda de 1628 cm^{-1} corresponde al modo de flexión del enlace O-H (Vargas *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2008; Zubieta *et al.*, 2012) (Chen *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Zubieta *et al.*, 2012), estas bandas fueron mostradas en la Figura 15 que corresponden al modos vibracionales de TiO_2 .

También se observan las bandas características los modos vibracionales del polivinil-alcohol, ubicadas en 1095 cm^{-1} que corresponde a los modos vibracionales del enlace -C-O (Omaram *et al.*, 2007), la banda de 1252 cm^{-1} corresponde al modo vibracional de flexión C-OH de los alcoholes (Arredondo *et al.*, 2011; Mallakpour y Barati, 2011), la banda de 1712 cm^{-1} corresponde al modo de tensión $\nu\text{ C=O}$ de los grupos acetato residuales (Omaram *et al.*, 2007; Arredondo *et al.*, 2011) y las bandas entre $2939\text{-}2912\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los grupos -CH y -CH₂ del polímero y la banda de 3407 corresponde al modo de vibración del grupo -OH (Hemanta *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2007; Attar *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2008; Arredondo *et al.*, 2011; Zubieta *et al.*, 2012).

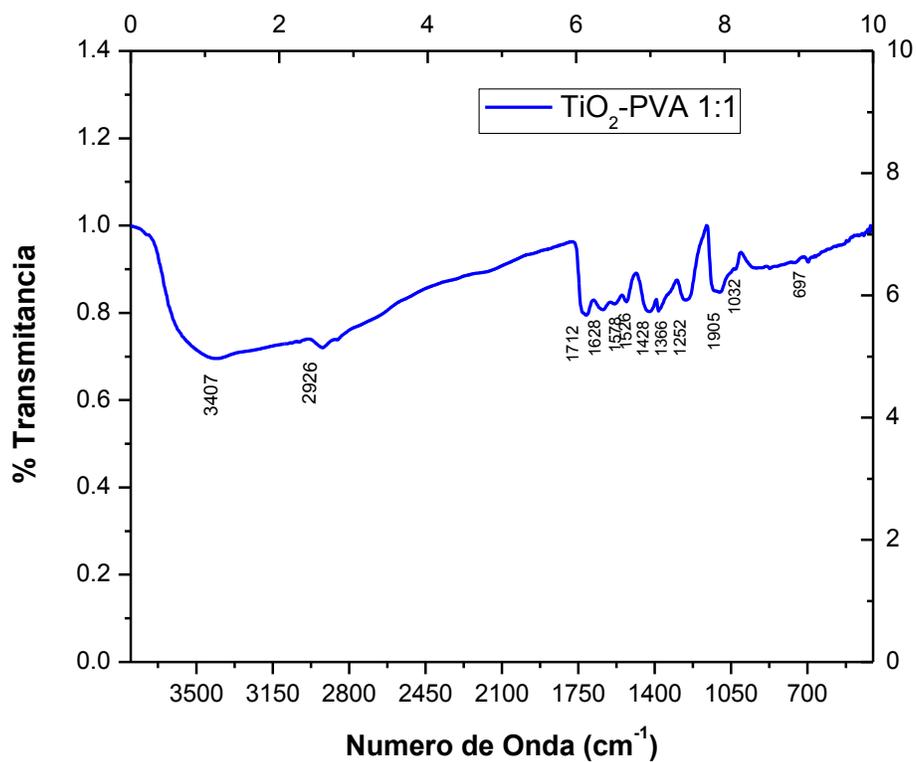


Figura 23. Espectros de IR de la muestra TiO₂-PVA 1:1.

En la micrografía de MEB, Figura 24 se muestra la morfología en polvo de TiO₂-PVA 1:1 secado a 40°C, observándose partículas de forma irregular formadas por pequeños gránulos.

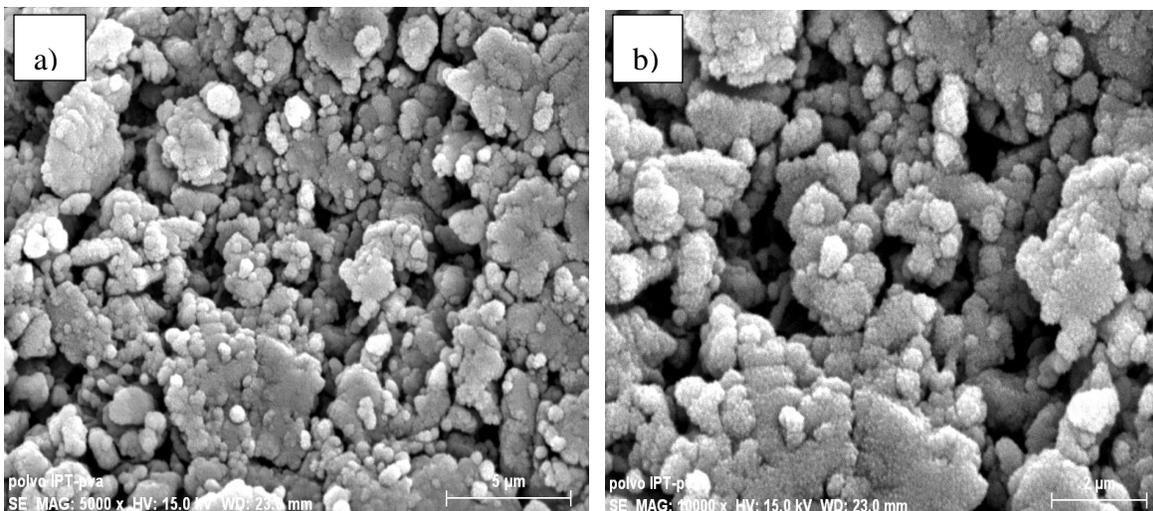


Figura 24. Micrografía de la mezcla TiO_2 -PVA 1:1 a) 5000X, b) 10000X.

En la Figura 25 se muestra el análisis químico elemental (EDS) de TiO_2 -PVA 1:1 en polvo, correspondiente a la Figura 22a, encontrándose en la muestra los elementos de Titanio (Ti), Oxígeno (O) y Carbono (C), este último elemento era de esperarse ya que es elemento base del polímero PVA.

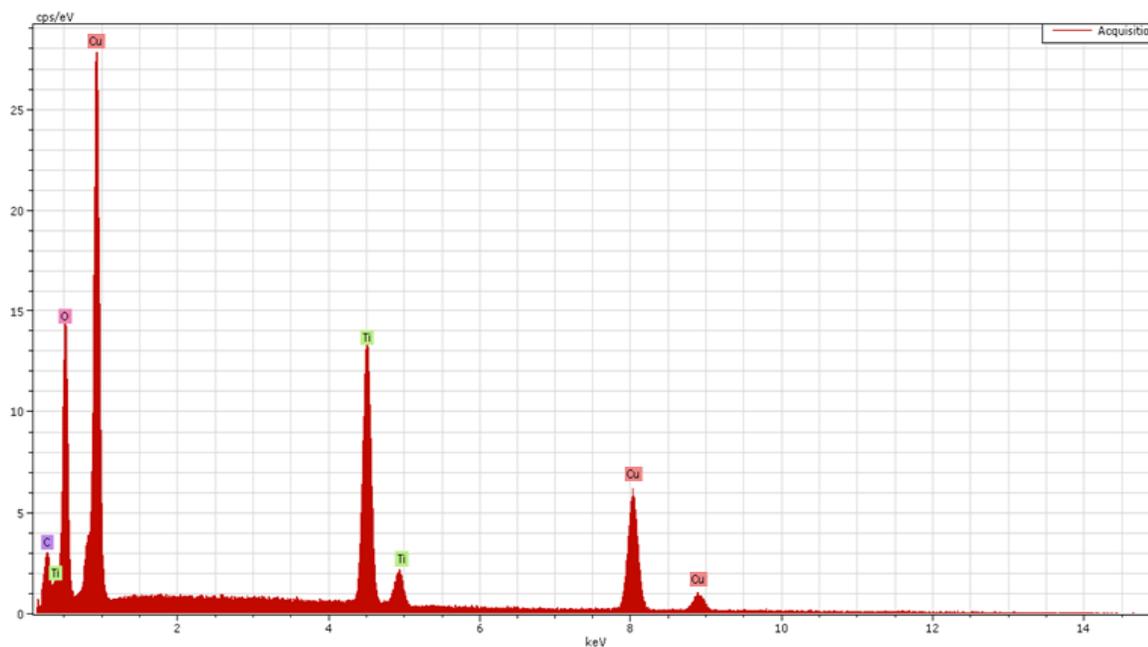


Figura 25. Espectro del Análisis Químico Elemental de TiO_2 -PVA 1:1.

La Figura 26 corresponde a la micrografía de MET de TiO_2 -PVA 1:1 y de secado a 40°C , observándose partículas de forma irregular de tamaño $>1\mu\text{m}$ y un contorno transparente que corresponde al polímero PVA.

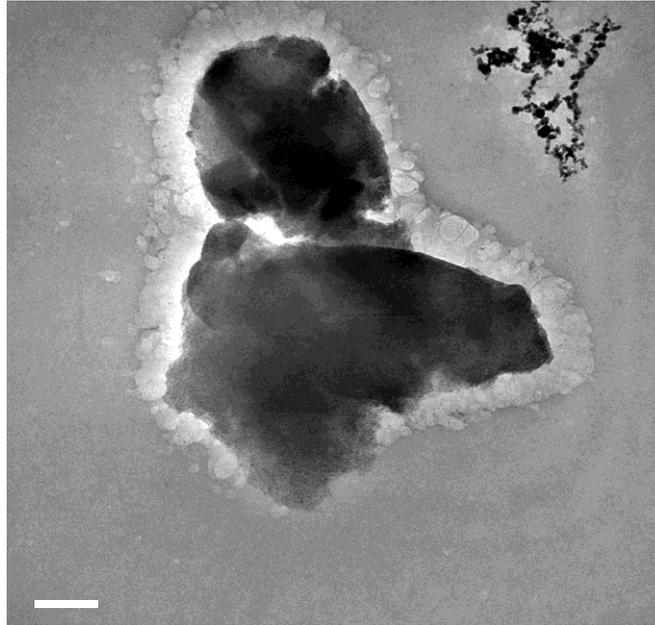


Figura 26. Micrografía de MET del TiO_2 -PVA 1:1.

6.2.2 Caracterización de los recubrimientos TiO_2 -PVA

El espectro de la Figura 27 corresponde al difractograma para el recubrimiento de TiO_2 -PVA 1:1, observándose en el ángulo 2θ los picos de 26.5° , 42.3° , 44.5° , 50.70° , 54.66° , 59.89° , 77.49° , 83.61° , 100.128° y etiquetados con el número 1, que coinciden con el patrón de difracción 00-056-0159 correspondiente al grafito (Figura 12), cabe mencionar que en este espectro de difracción no son evidentes todos los picos característicos del TiO_2 en fase cristalina anatasa, 2θ : 25.4° , 38.1° , 48.2° , 54.2° , 62.4° , 69.4° , 75.5° , que eran de esperarse por la presencia de este compuesto en la muestra, sin embargo, si se presentan en el ángulo 2θ los picos de 38.1° y 54.3° etiquetados con el número 2 correspondientes al TiO_2 para patrón de difracción

de Rayos-X 00-021-1272, picos que no son evidentes en el difractograma correspondiente al grafito (Figura 12).

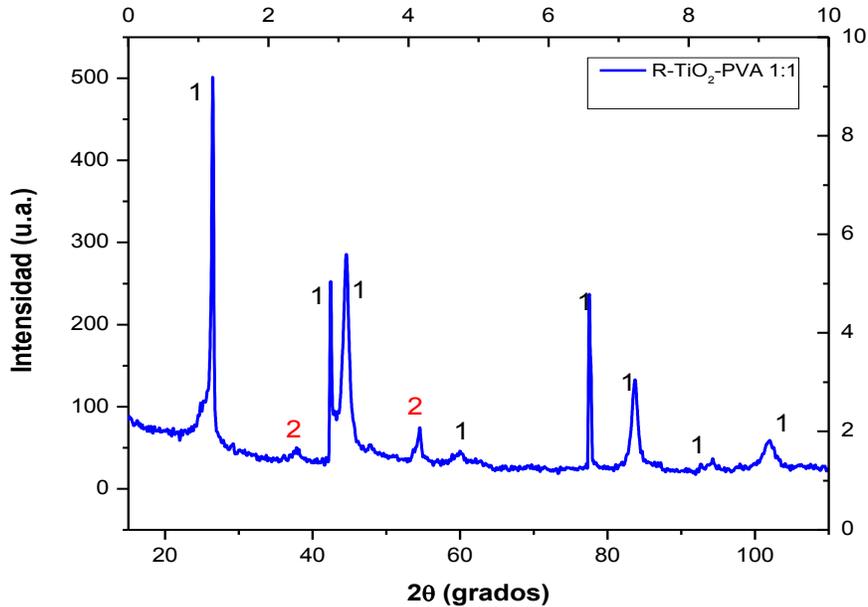


Figura 27. Espectro de Difracción de Rayos X del recubrimiento de TiO_2 -PVA 1:1 sobre grafito.

La Figura 28 corresponde al espectro de difracción para los recubrimientos: TiO_2 -PVA 1:2 y TiO_2 -PVA 1:3, observándose en el ángulo 2θ los picos característicos al grafito: 26.5° , 42.3° , 44.5° , 50.70° , 54.66° , 59.89° , 77.49° , 83.61° , 100.128° y etiquetados con el número 1, que correspondientes al el patrón de difracción 00-056-0159, (Figura 12), sin embargo, no se presentan picos correspondientes al TiO_2 (Figura 14), y que también eran de esperarse por la presencia de este compuesto en la muestra y que puede deberse a la mayor cantidad del polímero PVA con respecto al TiO_2 empleado en los recubrimientos.

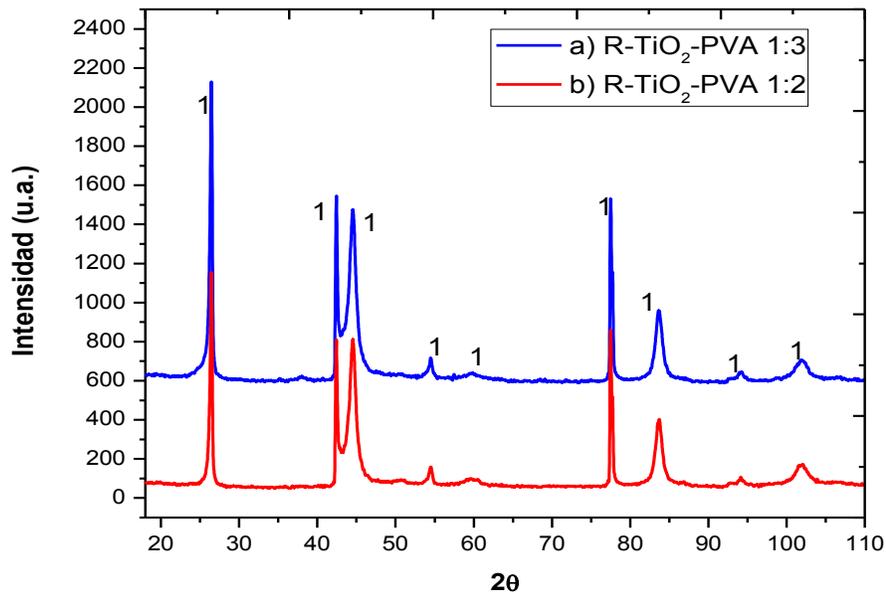


Figura 28. Espectros de Difracción de Rayos X de recubrimientos de TiO_2 -PVA sobre grafito.

En la Figura 29 se muestran las micrografías de MEB los recubrimientos de TiO_2 -PVA 1:1 sobre grafito, observándose un recubrimiento con partículas esféricas de tamaño nanométrico.

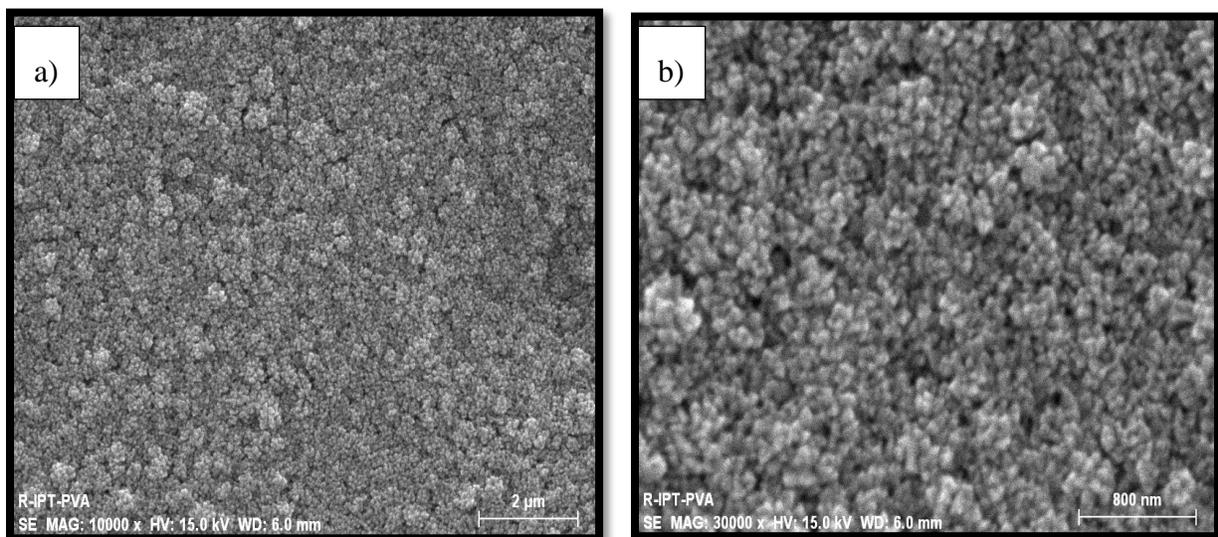


Figura 29. Recubrimientos de TiO_2 -PVA 1:1, a) 10,000X, b) 30,000X.

La Figura 30 corresponde al Análisis Químico Elemental (EDS) para el recubrimiento de TiO_2 -PVA en el grafito y correspondiente a la micrografía 27a, presentándose los elementos de Titanio (Ti), Oxígeno (O) y Carbono (C).

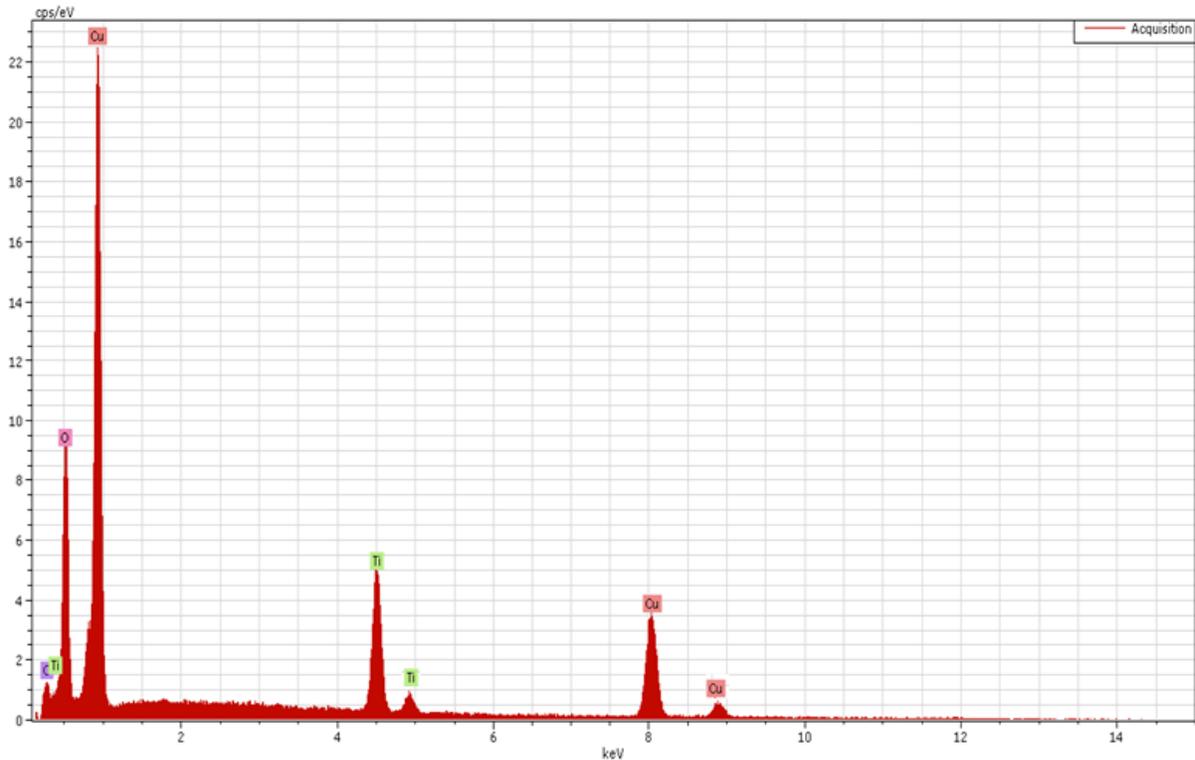


Figura 30. Espectro de análisis químico elemental del recubrimiento TiO_2 -PVA 1:1 en grafito.

En la Figura 31 se muestra la micrografía de MEB del recubrimiento TiO_2 -PVA 1:1 en la barra de grafito en corte longitudinal, en la cual se puede observar el espesor del recubrimiento etiquetado con el número 1, dicho recubrimiento muestra un espesor de aproximadamente 15 μm . y la etiqueta con el número 2 corresponde a la barra de grafito.

También se observa el análisis químico elemental (EDS) del recubrimiento de TiO_2 -PVA 1:1, en la zona etiquetada con el número 2 se presentan los elementos de: Carbono (C), Oxígeno (O) y Cobre (Cu) que corresponden a la base del grafito, mientras que la zona etiquetada con el número 1 se presentan los elementos de Titanio (Ti), Oxígeno (O), Carbono (C) y Cobre (Cu) que corresponde al recubrimiento de TiO_2 -PVA 1:1 Cabe mencionar que la presencia del

elemento Cobre (Cu) en los espectros de EDS es debido al proceso de metalización de las muestras con este elemento y hacerlas mas conductoras.

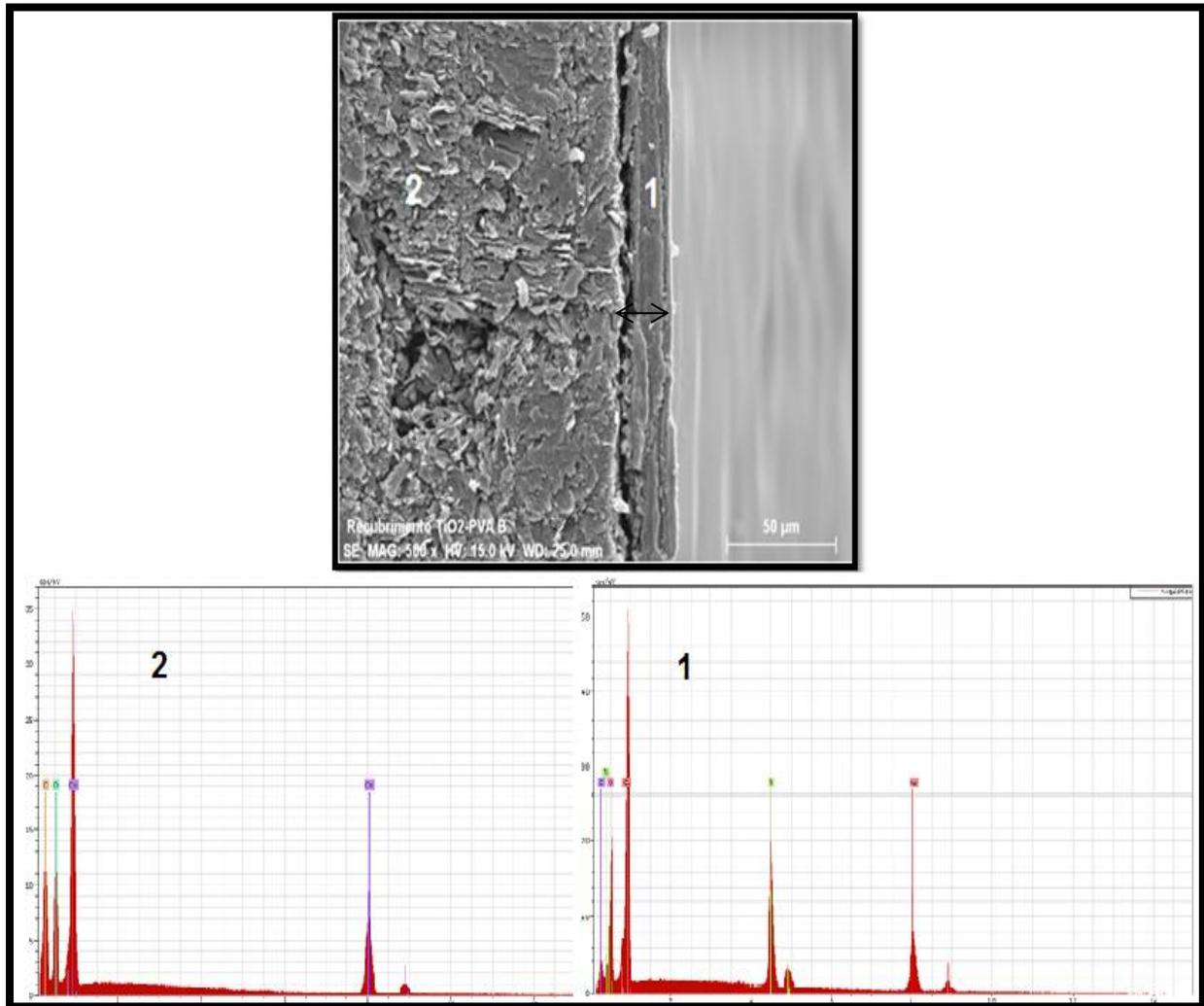


Figura 31. Micrografía del espesor del recubrimiento TiO_2 -PVA 1:1 y su análisis químico elemental.

6.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)

La caracterización electroquímica de los recubrimientos mediante la técnica de EIS en soluciones electrolíticas, nos proporcionó información sobre las interfaces involucradas en los recubrimientos y permitiendo evaluar su estabilidad frente a estas sustancias.

Para los diagramas de Nyquist, la representación de la componente real e imaginaria de la impedancia en el plano complejo; considerando que la impedancia total Z en un circuito de corriente alterna tiene la forma: $Z = Z' + Z''$

Dónde:

Z' corresponde a la parte real

Z'' corresponde a la parte imaginaria.

En la Figura 32 se muestra al espectro de impedancia en Diagrama de Nyquist para el recubrimiento TiO_2 -PVA 1:1 inmerso en una solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM en Buffer de Fosfatos 0.1M a pH 6.0, en comparación con el electrodo de grafito sin recubrir denominado blanco, y de acuerdo a los resultados de la Tabla 5, calculados a partir del ajuste en un circuito eléctrico equivalente, se obtuvieron valores de resistencia a la solución para el grafito en blanco de $R_s = 56.01 \Omega$, resistencia menor que el valor obtenido para el electrodo con recubrimiento, con un valor de $R_s = 67.95 \Omega$, lo cual pone de manifiesto que al haber recubrimiento, los iones no fluyen con facilidad.

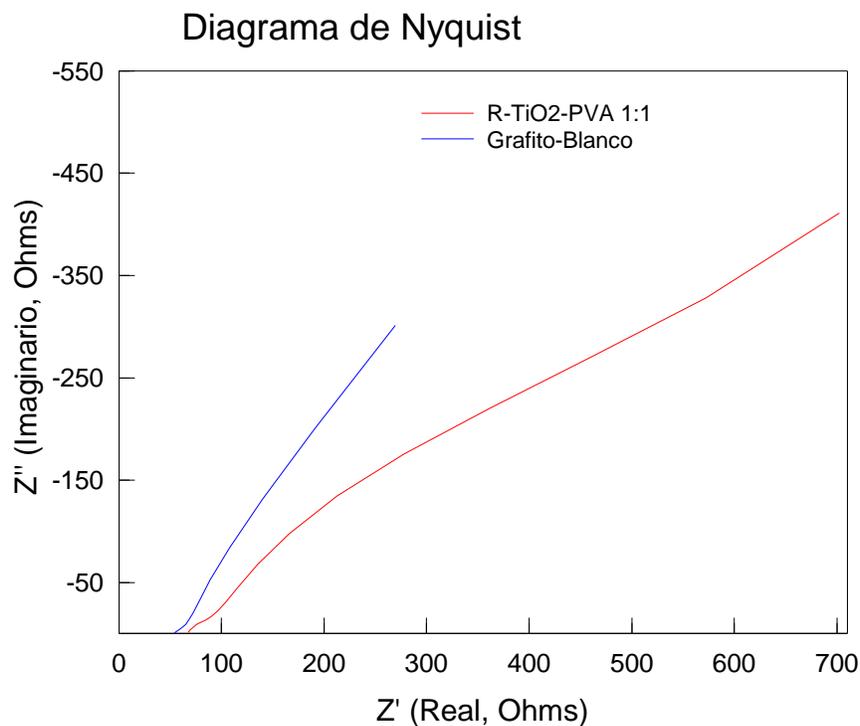


Figura 32. Espectro de EIS en diagrama de Nyquist del Recubrimiento TiO₂-PVA 1:1.

Así mismo, en la Figura 33 se muestra el espectro de impedancia en Diagrama de Bode para el recubrimiento TiO₂-PVA 1:1 y el electrodo grafito blanco en solución de K₃Fe(CN)₆ 5 mM en buffer de Fosfatos 0.1M a pH de 6.0, donde, a) corresponde al módulo de la impedancia vs la frecuencia y b) ángulo de fase vs la frecuencia.

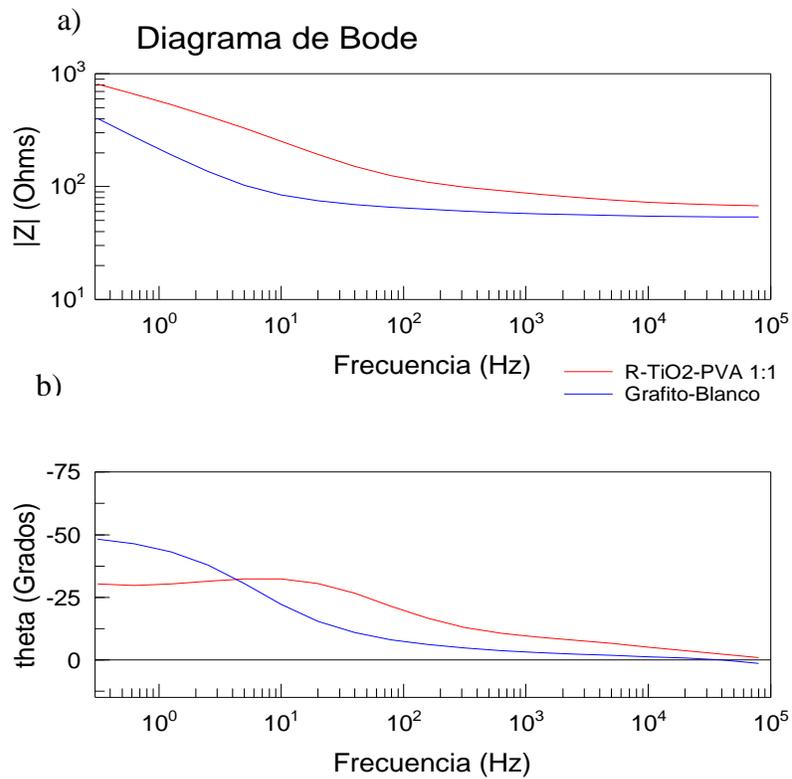


Figura 33. Diagrama de Bode, a) módulo de la Impedancia vs Fz, b) ángulo de fase vs Fz.

El espectro de la Figura 34 corresponde al análisis de impedancia en el diagrama de Nyquist del recubrimiento TiO₂-PVA 1:1 y grafito blanco, inmersos en la solución de K₃Fe(CN)₆ 5 mM en KCl 0.1M, obteniéndose valores de resistencia a solución de 12.29 Ω para el electrodo de grafito de la muestra blanco, con una resistencia R_s, menor al valor obtenido para el electrodo con el recubrimiento de 59.39 Ω, también mostrando valores mayores de resistencia a la solución R_s cuando hay presencia del recubrimiento.

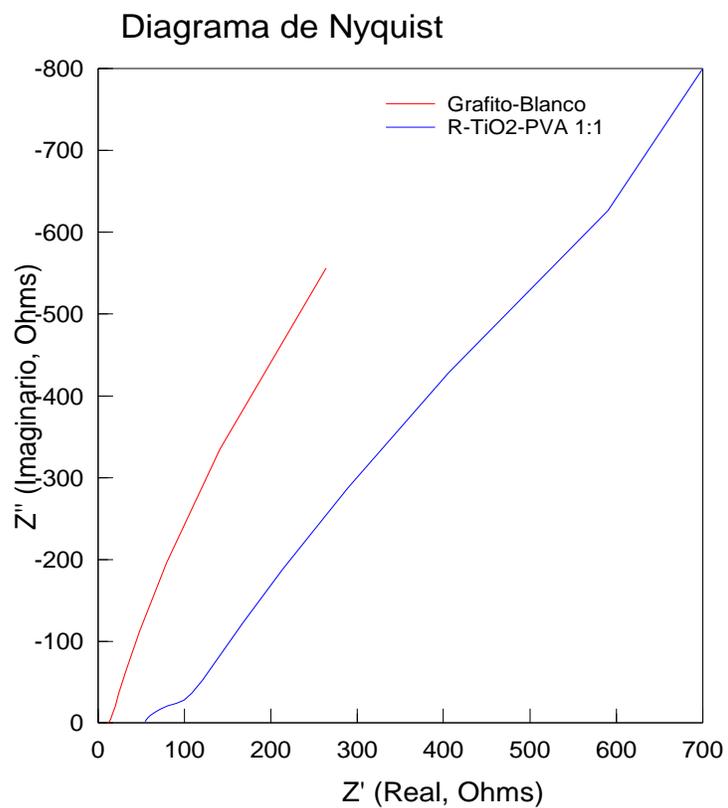


Figura 34. Diagrama de EIS del recubrimiento TiO₂-PVA 1:1.

La Figura 35 corresponde a EIS en diagramas de Bode del recubrimiento TiO₂-PVA 1:1, inmerso en K₃Fe (CN)₆ 5 mM en KCl 0.1M y mostrados en la Figura 34.

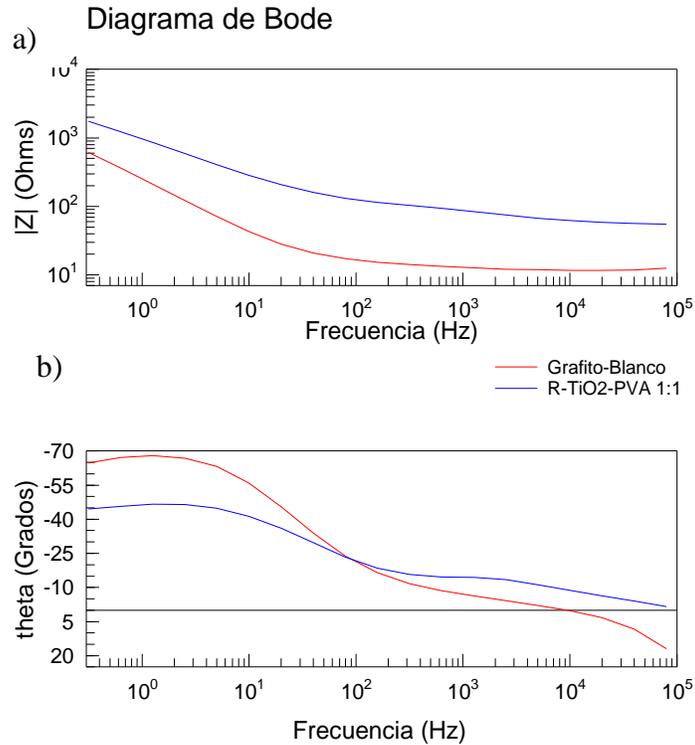


Figura 35. Diagrama de Bode, a) módulo de la Impedancia vs Frecuencia, b) ángulo de fase vs Frecuencia.

Con fines comparativos se muestran los diagramas de impedancia del recubrimiento TiO₂-PVA 1:1 inmerso en las soluciones de K₃Fe(CN)₆ 5 mM tanto en Buffer de Fosfatos como en KCl 0.1M, la Figura 36 etiquetada con el número 1 corresponde al Diagrama de Nyquist y con el numero 2 corresponde a los diagramas de Bode. De los datos calculados a partir del circuito equivalente de la Figura 37 se obtienen valores de resistencia a la solución de 67.95 Ω para recubrimientos inmersos en buffer y de inmersos en 59.39 Ω para recubrimientos en KCl, por lo que los iones fluyen con mayor facilidad en la solución de KCl.

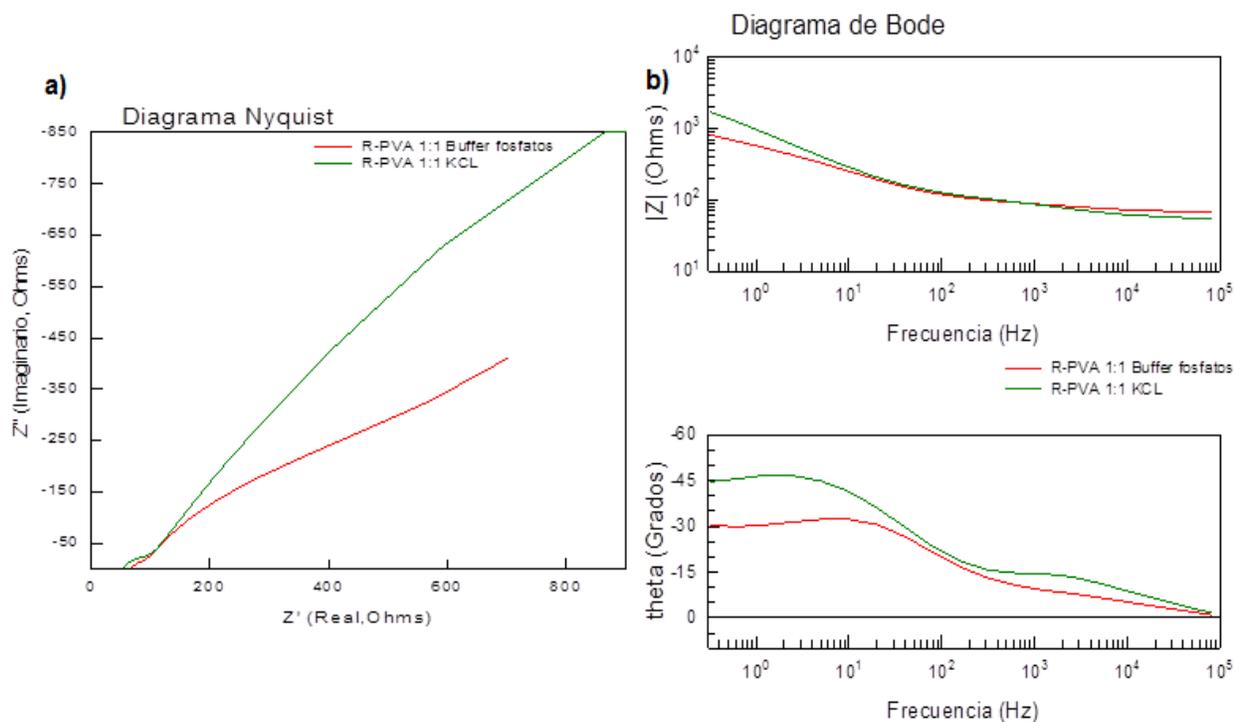


Figura 36. Diagramas de Impedancia, 1. Diagrama de Nyquist, 2. Diagramas de Bode.

Para obtener información cuantitativa de los diagramas de impedancia, se emplearon los circuitos eléctricos equivalentes; los cuales, son una forma eficiente y sencilla, de ajustar los espectros experimentales a un circuito, permitiendo asociar sus componentes eléctricos, a parámetros físicos del electrodo en estudio.

6.3.1 Circuito Eléctrico Equivalente (CEE)

Existen diversos tipos de CEE reportados empleados para el ajuste de los espectros de Impedancia y para simular lo que sucede electroquímicamente en la interfaz de los recubrimientos obtenidos se utilizó el circuito que corresponde a la celda de Randles (Arias *et al.*, 2009; Cárdenas *et al.*, 2013). El CEE que mostró un mejor ajuste a los espectros de impedancias obtenidos experimentalmente para los recubrimientos de TiO₂-PVA 1:1 se muestra en la Figura 37. Esta figura consta de tres elementos, una Resistencia a la solución o electrolito (R_s), un elemento de fase constante el cual representa la capacidad de la doble capa eléctrica (CPE_{dl}) y que presenta la región de la interface, de la solución líquida y la parte sólida del

electrodo (en el caso base de grafito en barra) con y sin recubrimiento, la resistencia (R_p) que puede ser considerada como la resistencia que presenta el electrodo a la transferencia de carga. El circuito de la Figura 37, también nos indica que la R_s está en serie con un circuito paralelo el cual está conformado por un CPE y un R_p .

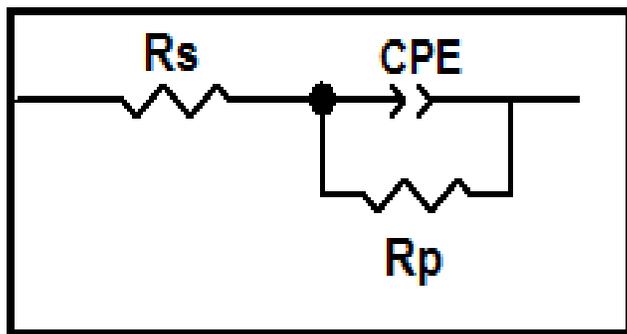


Figura 37. CEE utilizado para el ajuste de los diagramas de impedancia obtenidos experimentalmente.

Los ajustes se realizaron con elementos de fase constante CPE, y no con capacitores, ya que de acuerdo al análisis de SEM, los recubrimientos en el sustrato de grafito presentan cierta porosidad y una rugosidad en la superficie (Bard y Faulkner, 2001; Londoño y Jaramillo, 2011; Cárdenas *et al.*, 2013).

Los valores de los componentes del circuito eléctrico equivalente de la Figura 37, obtenidos del ajuste para los espectros obtenidos experimentalmente de los recubrimientos TiO_2 -PVA 1:1, en las dos soluciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de los componentes en el Circuito Eléctrico Equivalente.

Muestra	Rs (Ω)	Rp (Ω)	CPE	
			C _{dl} * (F cm ⁻²)	n
Grafito Blanco KCl	12.29	6823	9.42 E-04	0.7976
R-TiO ₂ -PVA 1:1 KCl	59.39	1.737 E+11	4.309 E-04	0.5257
Grafito Blanco Buffer fosfatos	56.01	23756	1.766 E-03	0.629
R-TiO ₂ -PVA 1:1 Buffer Fosfatos	67.95	2240	6.47 E-04	0.4896

*_{dl} doble capa eléctrica.

De los valores mostrados en la tabla anterior se puede notar que los valores de C_{dl} son mayores en muestras blanco que en los recubrimientos, lo cual nos indica que no en los recubrimientos los iones se difunden más rápidamente al electrodo. Mientras que los valores de n_{dl} indican que el comportamiento del elemento de fase constante está más cercano al de un elemento de difusión pendiente n < 0.8, que al de un capacitor n > 0.9, esto es debido a la porosidad y rugosidad que presentan los recubrimientos. Por su parte, R_s presentó mayores valores en los recubrimientos que las muestras blanco, que era de esperarse por la presencia del recubrimiento en los electrodos de grafito.

7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusiones

La técnica sol-gel permitió obtener TiO_2 en la fase cristalina anatasa a temperaturas menores a los 100°C , corroborándose por las técnicas de DRX, IR ER, MEB, MET y obteniendo un tamaño de cristal promedio de 8.4 nm.

Por difracción de rayos X en polvos para las mezclas de TiO_2 -PVA 1:3, 1:2, presentaron un pico en el ángulo 2θ de 19.3 correspondiente al polímero PVA, mientras que la relación TiO_2 -PVA 1:1 solo presentó los picos característicos de TiO_2 , debido a que esta relación conservó los picos característicos de la fase anatasa, fue la relación que se utilizó para para los recubrimientos.

Por Microscopia electrónica de barrido y transmisión (MEB y TEM) de polvos TiO_2 -PVA 1:1 se observan aglomerados del TiO_2 en el polímero en los recubrimientos, mientras que el tamaño de partícula del TiO_2 es del orden de 1300-150 nm

Se lograron obtener recubrimientos de TiO_2 -PVA 1:1 por simple mezcla y completamente adheridas al sustrato de grafito y secadas a temperatura ambiente. Por MEB se pudo medir el espesor del recubrimiento del orden de 15 μm .

El análisis de EIS en diagramas de Nyquist y Bode de los recubrimientos sintetizados se presenta un fenómeno de difusión, ya que en los gráficos no se logra apreciar los semicírculos y la pendiente tiene un inclinación menor 1, indicando que estos recubrimientos presentan rugosidad o falta de homogeneidad en la interface con el electrodo, propiedad que fue comprobada por MEB.

7.2 Perspectivas

Una vez concluido este proyecto de investigación, y analizado los resultados, se recomienda hacer algunos estudios adicionales que se mencionan a continuación:

1. Determinar el área superficial y el tamaño de distribución del poro de las mezclas TiO_2 -PVA, para la estimación de la cantidad de enzima que puede ser atrapada por este tipo de recubrimiento.
2. Determinar propiedades de rugosidad, adherencia del recubrimiento, así como la microdureza de la interface sustrato-recubrimiento, para mejorar la funcionalidad de los recubrimientos como matriz en la inmovilización de las enzimas.
3. Realizar otras técnicas electroquímicas, como la resistencia a la polarización y las curvas de polarización Tafel, las cuales permiten analizar el comportamiento a la resistencia la solución en los recubrimientos a diferentes tiempos de exposición, así como su degradación a la exposición en la solución por varios días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrezej, L.** 1999. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. Plenum publisher, New York, 32:123.248.
- Albella, J. M., Cintas, A. M., Miranda, T., Serratosa, J. M.** 2000. Introducción a la Ciencia de los Materiales “Técnicas de preparación y caracterización”, Consejo superior de Investigaciones y Ciencias.
- Andrade, E. G.** 2007. Activación y caracterización de materiales nanoestructurados (CNX, CST): remoción de cadmio. IPICYT, A, C. San Luis Potosí, Tesis de Maestría.
- Attar, A.S., Ghamsari, M.S., Hajiesmaeilbaigi, F., Mirdamadi, Shamsoddin.** 2008. Modifier ligands effects on the synthesized TiO₂ nanocrystals. J Mater Sci, 43:1723–1729.
- Arias, D. A., Caicedo, J.C., Ipaz, L., Aperador, W., Tirado, M. L., Zambrano, G., Gómez, M.E.** 2009. Caracterización estructural y electroquímica de películas de óxidos multifuncionales basados en TiO₂ por sputtering a diferentes concentraciones de oxígeno. Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 4:1479-1483.
- Bard, A.J., Faulkner L.R.** 2001. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2ª Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Brinker, C. J., Scherer, G. W.** Sol-gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Ed. Academic Press Inc. 1991. pp. 2-12.
- Cabrera, J., Paredes, C., Urday, E., Santiago, J.** 2007. Preparación y caracterización de película de alcohol polivinílico conteniendo nanopartículas de TiO₂. Revista Iberoamericana de Polímeros, 8 (4):323-332.
- Cárdenas, G. D.C., Acevedo, P. P., Córdoba, T. E.M.** 2013. Síntesis y caracterización de compuestos de hidroxiapatita/TiO₂ para aplicaciones biomédicas. Rev. LatinAm.Metal.Mat., 2:214-224.
- Cano, L. M.** 2008. Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Química Física y Termodinámica.
- Casares, F. A.B.** 2010. Análisis de polifenoles para vinos mediante técnicas de separación. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona España.

- Castro, O. L.P.,** Luna, P. V.M., Villalobos, P. R. 2007. Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Contaminantes Ambientales*. 23(1):35-45.
- Carralero, S.V.,** Mena, M.L., González, C.P., Yáñez-Sedeño, J.M.P. 2005. Development of tyrosinase biosensor base on gold nanoparticle-modified glassy carbón electrodes, application to measurement of bioelectrochemical polyphenols index in wine. *Analitica ChimicaActa*, 528: 1-8.
- Chawla, S.,** Rawal, R.,Shabnam, R.C.,Kuhad-Pundir C.S. 2011. An amperometric polyphenol biosensor basenon laccase immobilized on epoxy resin embrana. *Analytical Methodos*, 3: 709-714.
- Chen, H-J.,**Wang, L., Chiu, W-Y. 2007. Chelation and Solvent effect on the preparation of titania colloids. *Materials Chemistry and Physics* 101:12–19.
- Chen, X.,** Mao, S.S. 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem.Rev.*, 107:2891:2959.
- Cullity, B.D.,** Stock, S. R. 2001. *Elementos of X-Ray Difraccion*. 3a Ed. Pretince Hall.
- Dimitriev, Y. I.**2008. History of Sol-Gel Scence and Technology (Review). *Journal of the University of Chemical Tecnology and Metallurgy*, 43, 181-192.
- Eremia, S. A.V.,** Vasilescu, I., Radoi, A., Listecu, S-C., Radu, G-L. 2013. Disposable biosensor based on platinum nanoparticles-reduced graphene oxide-laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content. *Talanta*, 110: 164-170.
- Fernández, F. M.,** Sanromán, M.A., Moldes, D. 2012. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 1:1-16.
- Flores, M.D.M.,** Sandoval, C.J., Valdibia, U.B., Aguilar, G.C.N., 2010. Uso de técnicas electroquímicas para evaluar el poder antioxidante en alimentos. *Investigación y Ciencia*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 49:20-25.
- Genesca, Llongueras, J.** 2002. Técnicas Electroquímicas para el control y estudio de la corrosión. XVI Congreso de la sociedad Mexicana de Electroquímica, Facultad de Química, UNAM, México DF.
- Gomes, S.A.S.S.,** Rebelo, M.J.F. 2003. A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors*, 3:166-175.

- Gómez, S.,** Del Valle, M., Alegret, S., Privinori, M. I. 2008. Caracterización de la enzima lacasa en biocompositos para la determinación del índice de polifenoles en vino. *GrupSensors i Biosensors*. Universidad Autónoma de Barcelona. Balleterra España, 2:425-429.
- González, C. J.B.,** García, C. Z.Y., Prokhorov, E., Luna, B. J.G., Mendoza, D. M.E., Lara, R. J., E. del R. R., Sánchez, I.C. 2012. Revisiting the Thermal Relaxations of Poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science*, 125:4082-4090.
- González, C. J.B.,** Prokhorov, E., Sánchez, I.C., Luna, B. J.G., Manzano, R. A., González, H. J., Lopez, C. Y., E del R. R. 2012. Molecular Dynamics of PVA-AgnP Composites by Dielectric Spectroscopy. *Journal Nanomaterials*, 12:1-12.
- González, R.V.,** García, I.E., Ruiz, G.O., Gago, C.L. 2005. Aplicaciones de los biosensores en la Industria Agroalimentaria. *Informe de Vigilancia Tecnológica*. Madrid España, 14-90 pp.
- Gupta, S. M.,** Tripathi, M. 2011. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*. 56 (16): 1639-1657
- Guzmán, A.M.,** Fernández, A.M., Y. Bautista, F. J.H., Rodríguez, P. J.E. 2007. Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona. *Rev. Acad. Colombia Cienc.*, 31(121): 529-536.
- Hemantha, K. G.N.,** Lakshmana, R. J., Gopal, N.O., Narasimhulu, K.V., Chakradhar, R.P.S., Varada, R. A. 2004. Spectroscopic investigations of Mn 2+ ions doped polyvinylalcohol films. *Polymer*, 45:5407-5415.
- Hernández, E. J.M.,** García, S. L.A., Zeifert, S. 2008. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de N-TiO₂- Anatasa. *Superficies y Vacío*, 21(4): 1-5.
- Hobart, H. W.,** Lynne, L., Merritt, J., Dean, J.A., Frank, A. S.J. 1988. *Métodos Instrumentales de Análisis*. Editorial Iberoamericana, México.
- Ibarra, E. P.,** Ramírez, S. M.T., Rojas, H. A., Palomar, P. M. 2010. Biosensores Amperométricos Basados en Polifenoloxidasas para la Determinación de la Capacidad Antioxidante en Extractos de Uvas. *Sociedad Mexicana de Electroquímica*, 1029-1036.
- Jiménez, C. C.,** León, P.D. 2009. Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el Control de calidad de Procesos y Productos Alimenticios. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 16(1):144-154.

- Jiuhong**, Y., Songqin, L., Huangxian, J. 2003. Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 509- 514.
- Kochana**, J., Gala, A., Parczewski, A., Adamski, J. 2008. Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. *Anal Bioanal Chem*, 391:1275–1281.
- Kudanga**, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S. 2011. Potencial applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 48:195-208.
- Liu**, L., Xiao, L., Yang, F. 2009. Terylene membrane modification with polyrotaxanes, TiO₂ and Polyvinyl alcohol for better antifouling and adsorption property. *Journal of Membrane Science*, 333:110-117.
- Londoño**, M.E. Jaramillo, J.M. 2011. Comportamiento dieléctrico de hidrogeles de alcohol polivinílico obtenidos por técnica de congelamiento/descongelamientos. *Dyna*, 78(165):132-137.
- Macwan**, D. P., Dave, P. N., Chaturvedi, S. 2011. A review on nano -TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. *J Mater Sci*, 46: 3669-3686.
- McCreery**, R.L. 2000. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. Editorial Wiley-Interscience, USA.
- Mallakpour**, S., Barati, A. 2011. Efficient preparation of hybrid nanocomposite coatings on poly(vinyl alcohol) and silane coupling agent modified TiO₂ nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, 71:391-398.
- Medina**, V. J., García, S. J., Frausto, R. C., Calixto, S. 2005. Encapsulamiento de anatasa comercial en películas delgadas de TiO₂ depositadas sobre micro-rodillos de vidrio para la fotodegradación del fenol. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4:191-201.
- Muñoz**, D. K., Bravo, M. K.E., Zapata, O. P., Londoño, L. J. 2007. Caracterización preliminar de la enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia Et Technica*, 13(33): 161-164.
- Nakamoto**, K. 1997. *Infrared and Raman spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and application in Inorganic Chemistry*. 5^a Ed. Wiley-Interscience Publication.

- Ochoa, Y.,** Ortégó, Y., Rodríguez, P. J. E. 2010. Synthesis of TiO₂, anatase phase by the sol-gel method: study of the effect of the presence of AcacH in the system. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 52:29-40.
- Omkkaram, I.,** Srerkanth, P. R.P., Lakshmana, R. J.2007. EPR, optical, infrared and Raman studies of VO₂⁺ ions in polyvinylalcohol films. *Physia B*, 388:318-325.
- Pottier, A.,** Cassaignon, S., Chanéac, C., Villain, F., Tronc, E., Jolivet, J-P. 2003. Size tailoring of TiO₂ anatasa nanoparticles in aqueous medium and synthesis of nanocomposites. Characterization by Raman spectroscopy. *Journals of Materials Chemistry*, 13:877-882.
- Sánchez, A. A.,** Martinez, F. M., Chicharro, M. 2012.The role electroanalytical techniques en analysis of polyfenols en wine. *Trends in Analytical Chemistry*, 34:78-96.
- Sánchez, A. A.,** Martinez, F. M., Moreno, M., Bermejo, E., Zarpadiel, A., Chicharro, M. 2013. Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. *Food Chemistry*, 136: 1183-1192.
- Sánchez-Paniagua, L.M.** 2008. Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos.Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid, España.
- Ting, Z.,** Bozhi, T., Jilie, K., Pengyuan., Y., Baohong, L. 2003. A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic organic hybrid titania sol-gel matrix. *Analytica Chimica Acta*, 489:199–206.
- Vázquez, N. G.,** Echeverría, O. 2000. Introducción a la Microscopia aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, México DF. p. 94-107. **Wang, J.**2000. *Analytical Electrochemistry*. 2 Ed. John Wiley & Sons, Inc, pp 28-36.
- Williams, D.B.,** Carter, C.B. 2009.*Transmisison Electron Microscopy, A Textbook for Materials Sciencie*, 2da Edition, Ed. Springer.
- Zacco, E.** 2006. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal, aplicación en sensores. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Balletera España.
- Zubieta, C.E.,** Messina, P.V., Schulz, P.C. 2012.Photocatalytic degradation of acridine dyes using anatase and rutile TiO₂. *Journal of Environmental Management*, 101:1-6.

ANEXO 1

A continuación se presentan las constancias de ponencias en congresos.

