



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

Desarrollo de un sensor amperométrico basado en nanoestructuras de oro para detección de vainillina en helados y bebidas lácteas saborizadas



Opción de titulación

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciatura en Ingeniería en nanotecnología

Presenta:

Eva Carina Breña Cruz

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Presidente

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Secretario vocal

Dr. Andrés Dector Espinoza

Suplente 1

Dra. Alejandra Álvarez López

Suplente 2

Centro Universitario

Querétaro, QRO

México.

Mayo 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo de un sensor amperométrico basado en
nanoestructuras de oro para detección de vainillina en
helados y bebidas lácteas saborizadas

por

Eva Carina Breña Cruz

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-262905

1. Resumen

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-3-metoxibenzaldehído) es ampliamente utilizada en la industria alimentaria, siendo la industria de los helados y bebidas lácteas el área la principal, por lo que es importante evaluar su concentración en este tipo de productos para evitar posibles adulteraciones o mala calidad, que podrían tener efectos dañinos a la salud de los consumidores.

En los últimos años se han desarrollado electrodos para la determinación de la vainillina. Sin embargo, su rango de detección está por debajo del rango de concentración de vainillina presente en helados y bebidas lácteas aromatizadas, que oscila entre 0,6 mM y 3,3 mM; o bien en el caso de otros electrodos se requiere un tratamiento previo de la muestra, lo que implica un mayor consumo de reactivos y tiempo, haciendo menos práctica la evaluación de las muestras.

En este trabajo se propuso un método electroquímico de detección y cuantificación de vainillina mediante el uso de un electrodo de carbón vítreo recubierto con una tinta de nanopartículas de oro soportadas en carbón vulcan y dispersas en Nafion (AuNP/carbón vulcan-Nafion) y con una tinta de un compuesto de nanopartículas de oro e hidróxidos doble laminares soportadas en carbón vulcan y dispersas en Nafion (LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion), con el propósito de evaluar las propiedades catalíticas y electroquímicas que exhiben las nanopartículas de oro y poder comparar como afecta su dispersión en el método de detección.

En este trabajo de tesis, la síntesis de AuNPs se llevó a cabo por el método de reducción química y coprecipitación para la síntesis de LDH-AuNPs. Posteriormente, ambos materiales se caracterizaron por SEM y se utilizaron para evaluar la concentración de vainillina en soluciones buffer, helados y bebidas lácteas saborizadas.

Los métodos de detección fueron electroquímicos y a partir de ellos se pudo realizar la curva de calibración, se obtuvieron las ecuaciones de diseño y el límite de detección en cada uno de los productos donde se evaluó la vainillina (buffer, leche saborizada y helado). Los resultados mostraron que ambos materiales son capaces de detectar vainillina dentro del rango esperado, son sensibles y específicos y presentan un buen nivel de reproducibilidad.

Los procesos de detección y cuantificación de vainilla fueron rápidos, tomando alrededor de 10 minutos por prueba, por lo que se comprobó su rapidez y eficiencia. Este método proporciona un tiempo de respuesta rápido y un bajo coste, en comparación con los métodos convencionales de detección de vainillina en la industria alimentaria.

Palabras clave: vainillina, AuNP, LDH-AuNP, sensor, electroquímica.

2. Abstract

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxy-3-methoxybenzaldehyde) is widely used in the food industry, being the ice cream and dairy beverage industry the main area, so it is important to evaluate its concentration in this type of products to avoid possible adulterations or poor quality, which could have harmful effects on the health of consumers. In recent years, electrodes have been developed for the determination of vanillin. However, their detection range is below the concentration range of vanillin present in ice cream and flavored milk drinks, which ranges from 0.6 mM to 3.3 mM; or in the case of other electrodes, a previous treatment of the sample is required, which implies a higher consumption of reagents and time, making the evaluation of the samples less practical.

In this work we proposed an electrochemical method for the detection and quantification of vanillin using a glassy carbon electrode coated with an ink of gold nanoparticles supported on vulcan carbon and dispersed in Nafion (AuNP/vulcan carbon-Nafion) and with an ink of a composite of gold nanoparticles and double lamellar hydroxides supported on vulcan carbon and dispersed in Nafion (LDH-AuNP/vulcan carbon-Nafion), in order to evaluate the catalytic and electrochemical properties exhibited by the gold nanoparticles and to compare how their dispersion affects the detection method.

In this thesis work, the synthesis of AuNPs was carried out by the chemical reduction and coprecipitation method for the synthesis of LDH-AuNPs. Subsequently, both materials were characterized by SEM and used to evaluate the concentration of vanillin in buffer solutions, ice cream and flavored milk drinks. The detection methods were electrochemical and from them it was possible to perform the calibration curve, the design equations were obtained and the detection limit in each of the products where vanillin was evaluated (buffer, flavored milk and ice cream). The results showed that both materials are capable of detecting vanillin within the expected range, are sensitive and specific and present a good level of reproducibility. The vanillin detection and quantification processes were fast, taking about 10 minutes per test, thus proving their speed and efficiency. This method provides fast turnaround time and low cost compared to conventional methods for vanillin detection in the food industry.

Keywords: vanillin, AuNP, LDH-AuNP, sensor, electrochemistry.

3.-Índice

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3.-Índice	4
4. Introducción	7
5. Planteamiento del problema	11
6. Justificación	12
7. Hipótesis	14
8. Objetivos	14
8.1 Objetivo general	14
8.2 Objetivos Específicos	14
9.-Marco teórico	16
9.1 Vainillina	16
9.2 Vainilla	16
9.3 Usos de la vainillina	17
9.4 Interés científico de la vainillina	18
9.5 Obtención de vainillina natural	18
9.6 Obtención de vainillina sintética	20
9.7 Mercado de la vainillina	20
9.8 Fraude y seguridad alimentaria relacionada con la vainillina	21
9.9 Vainillina en helados	22
9.10 Factores a considerar en la cuantificación de la vainillina	23
9.11 Efectos de una concentración diferente de vainillina	25
9.12 Cuantificación tradicional de vainillina dentro de la industria	25
9.13 Sensores	26
9.14 Sensores químicos	27
9.15 Sensores electroquímicos	28
9.16 Implementación de la nanotecnología en el sensado	29
9.17 Nanopartículas de oro	30
9.18 Nanopartículas de oro soportadas en hidróxidos doble laminares	31
10.-Metodología	34
10.1 Síntesis de las AuNPs	34

10.2 Síntesis del LDH-AuNPs	35
10.3 Reactivos y Equipo	38
10.4 Preparación de tinta a) AuNP/carbón vulcan - Nafion	38
10.5 Preparación de la tinta b) LDH-AuNP/Carbón Vulcan - Nafion	39
10.6 Preparación del sensor de vainillina	39
11.- Resultados y Discusión	41
11.1 Caracterizaciones fisicoquímicas	41
11.1.1 Microscopia UV-vis.....	41
11.1.2 Microscopia SEM para las AuNPs/carbón vulcan.....	43
11.1.3 Microscopia SEM para las LDH-AuNPs/carbón vulcan.....	45
11.1.4 Microscopia XRF para las LDH-AuNPs/carbón vulcan	47
11.1.5 Análisis Raman para las LDH-AuNPs/carbón vulcan	48
11.2 Caracterizaciones electroquímicas de las AuNPs/carbón vulcan-Nafion	49
11.2.1 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNP/carbón vulcan - Nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5	49
11.2.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5	53
11.2.3 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan - Nafion en leche entera	56
11.2.4 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion en leche entera.....	58
11.2.5 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan - Nafion en helado.....	61
11.2.6 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion en helado	64
11.3 Caracterizaciones electroquímicas de las LDH-AuNPs/carbón vulcan	66
11.3.1 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5	66
11.3.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5.....	71
11.3.3 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNPs en leche entera Araceli... 76	
11.3.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en leche entera Araceli.....	79
11.3.5 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion en helado.....	82

11.3.6 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón-vulcan-Nafion en helado	85
11.3 Comparacion entre materiales	88
10 Conclusión.....	92
11 Referencias.....	95

4. Introducción

La vainilla, es un agente saborizante de amplio uso en las industrias de alimentos, fragancias y farmacéuticas (Walton *et al.*, 2003). El mercado de vainas de vainilla es altamente fluctuante en términos de disponibilidad, precio y calidad, debido a variaciones en el rendimiento de las cosechas a causa de fluctuaciones del clima, enfermedades, descritas en la Tabla 1, así como motivos económicos y políticos. La calidad, así como la disponibilidad de la vainilla no se debe ver afectado por la cantidad limitada de vainas cultivadas a consecuencia de estos factores, lo que ha conducido al desarrollo de vainillinas sintéticas (Luis-Rojas *et al.*, 2020).

Tabla 1. Principales enfermedades de las plantaciones de vainilla (Hernández, 2011).

Origen	Efectos
Hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	<p>Causa la pudrición de las raíces, tallos y frutos, y la mortalidad de las plantas. Se encuentra hasta cierto punto donde se cultiva la vainilla, principalmente donde el manejo es deficiente y / o en plantas que están dando fruto.</p> <p>Cuando <i>Fusarium</i> infecta la planta, es muy difícil o imposible de eliminar.</p>
Hongo <i>Colletotrichum sp.</i>	<p>Ataca hojas, frutos, tallos y flores. Se identifica por pequeñas manchas hundidas que son de color marrón oscuro. Las frutas infectadas caen de la planta antes de que maduren, por lo que el rendimiento general disminuye, a veces hasta en un 50%.</p>
Hongo <i>Uromyces joffrini</i>	<p>La roya se identifica por la presencia de pústulas redondas de color amarillo anaranjado en el envés (lado abaxial) de las hojas. A medida que</p>

	<p>se desarrolla el óxido, las pústulas crecen y se fusionan, y finalmente secan toda la hoja.</p> <p>Las plantas infectadas con óxido dejan de desarrollarse y, por lo tanto, su capacidad productiva se reduce. Sin tratamiento, el óxido puede defoliar plantas o plantaciones enteras.</p> <p>Las hojas infectadas se sacan del vainillal y se entierran.</p>
<p>Complejo de especies <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> y <i>Colletotrichum sp.</i></p>	<p>El amarillamiento y la caída de la fruta inmadura se manifiestan a altas temperaturas superiores a 32 ° C y baja humedad relativa (<80%), durante meses de luz solar intensa.</p> <p>La caída de la fruta ocurre 2 meses después de la polinización, principalmente en junio, después de una fuerte lluvia. La caída de fruta varía del 15 al 90%, dependiendo del sistema de cultivo.</p>
<p>La “chinche roja” (<i>Tentecoris confusus</i>)</p>	<p>La chinche es la plaga de vainilla más dañina que causa daños en los tejidos de las hojas, tallos y frutos. Las heridas dejadas por la chinche permiten la colonización de hongos y bacterias que causan podredumbre, marchitez y defoliación.</p>

En la industria de los alimentos el 75% de la vainillina se destina a las industrias del chocolate, helados y productos lácteos. En 2010 la producción global de helado fue de 16.3 billones de litros donde los sabores más populares fueron vainilla, chocolate, fresa, napolitano y limón, en ese orden. Sin embargo, en la mayoría de formulaciones la vainillina representa un ingrediente base (Goff & Hartel, 2013). Dependiendo del sabor, origen,

contenido de grasa y aditivos, la concentración de la vainillina varía entre 0.6 a 3.3 mM mientras que el pH se mantiene alrededor de 6.5 (Anklam, *et al.* 1997; Ohmes, 1998).

La vainillina es el compuesto principal de la vainilla, lo que le da su distintivo sabor y aroma. La vainillina natural es una de las especias más caras y falsificadas del mundo, mientras que la vainillina artificial tiende a ser adulterada y en caso de no ser adecuadamente purificada, llega a tener trazas de solventes, reactivos y subproductos.

Estos representan problemas tanto de calidad del producto como un riesgo a la salud de los consumidores. Por lo que es importante cuantificar la cantidad real de vainillina en los extractos iniciales y en el producto final.

Dentro de la industria, el tiempo y costo de los procesos de producción marcan un eje central, por lo que es necesario métodos asequibles, selectivos, sensibles, simples y de rápida detección para monitorear la concentración de la vainillina. Sin embargo, los métodos actuales de detección (cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gases, electroforesis capilar y espectrofotometría UV) requieren equipos de grandes dimensiones que también son costosos, preparación y transporte de muestras en algunos casos, lo que también involucra un costo de tiempo.

Los sensores electroquímicos representan una solución por su bajo costo de construcción y operación, análisis rápidos, sensibilidad mejorada y simplicidad. Para mejorar la selectividad y sensibilidad se han investigado nanomateriales, sobre todo nanomateriales metálicos, ya que mejoran notablemente la transferencia electrónica por su alta capacidad de transferencia de carga, esto los vuelve altamente sensibles a los cambios en la carga, la cual es dependiente directamente de la concentración del analito que se desea cuantificar.

Gracias a que la vainillina es un compuesto electroactivo es posible cuantificarla a través de su oxidación, es decir, por la transferencia de electrones al incidir sobre ella un voltaje específico.

Hasta ahora se han investigado diferentes materiales para desarrollar electrodos para la detección y cuantificación de la concentración de vainillina, sin embargo, aún existen pocos sensores para esta aplicación y el número se reduce aún más si específicamente nos enfocamos en el rango de concentración de vainillina en productos específicos como helados

o bebidas lácteas saborizadas, ya que involucra también la evaluación de las características particulares de estos productos como pH, temperatura, incorporación de aire e interferentes propios del producto, como lactosa, sacarosa y glucosa, por lo que el desarrollo de un sensor de vainillina en estas áreas resulta en un desarrollo de alto impacto industrial y de investigación.

Algunos ejemplos de sensores que se han investigado para la determinación de la vainillina se encuentran en la tabla 2, donde la mayoría han sido evaluados en productos como extractos, galletas, chocolate y galletas cubiertas de chocolate, sin embargo, en la mayoría no se encuentran dentro del rango de la concentración de vainillina en helados y bebidas lácteas saborizadas; el electrodo modificado con PVC/grafito es el único que se encuentra en el rango de la concentración de vainillina en helados y bebidas saborizadas, sin embargo el proceso de detección requiere que la muestra sea acidificada, lo que implica un tratamiento previo de la muestra a analizar y, por lo tanto, conlleva un mayor consumo de reactivos y tiempo, haciendo menos practica la evaluación de muestras.

Tabla 2. Sensores desarrollados para la identificación y cuantificación de vainilla.

Electrodo	Rango de operación	Límite de detección	Referencia
CFME cilíndrico	10-700 μ M	4.2 μ M	(Agui et al., 1999)
Electrodo de grafito	5-400 μ M	0.4 μ M	(Bettazzi et al., 2006)
Carbón vítreo	50-300 μ M	0.16 μ M	(Hardcastle et al., 2001)
Grafito/PVC	0.66-9.2mM	0.29mM	(Luque et al., 2000)
Microelectrodo de fibra de carbono /Au-AgNPs/Carbono vítreo	0.2-50 μ M	0.04 μ M	(Zheng et al., 2010)
Carbón vítreo/grafeno	0.1-7 μ M	0.056 μ M	(Peng et al., 2012)
AuPd- grafeno/carbón vítreo	10-40 μ M	0.02 μ M	(Shang et al., 2014)

Por esta razón el desarrollo de un sensor específico que sea capaz de determinar la presencia de vainillina y los cambios de concentración de forma sensible representan un gran avance en las etapas de evaluación de calidad de productos alimenticios dentro de la industria.

5. Planteamiento del problema

Puesto que la vainillina, ya sea de origen sintético o natural, es uno de los principales saborizantes dentro de la industria alimentaria en México como en el resto del mundo (Luis-Rojas *et al.*, 2020; Walton *et al.*, 2003), la cuantificación de la misma se ha convertido en un proceso imperante dentro de todas las industrias que la incluyen como una de sus materias primas, ya que se requiere que los productos finales contengan las cantidades adecuadas de vainillina, y por tanto, poder garantizar los más altos estándares de calidad de los mismos, principalmente en aquellos productos que pasan a través de procesos que pueden degradarla, como es el caso de la pasteurización de productos lácteos, donde se pueden sufrir alteraciones en la temperatura y el pH, y con ello, alterar la concentración en el producto final.

Por otro lado, al ser una de las especias más empleadas en el mundo y de las más costosas cuando se trata del extracto natural, se ha vuelto también una de las especias más falsificadas, principalmente mediante la adulteración de la misma a través de compuestos con propiedades organolépticas muy similares a la molécula de la vainillina, lo cual, dentro de sus consecuencias, además de traer daños severos a la economía relacionada al mercado de la vainilla, así como al de los extractos obtenidos de manera sintética, la adición de estos adulterantes también pueden llegar a producir efectos nocivos en la salud de los consumidores finales y aunado a su amplio uso en una gran cantidad de productos lácteos, sus alcances pueden llegar a ser graves.

Por sí mismo, el exceso de vainillina puede generar efectos severos incluyendo dolores de cabeza por migraña, emesis, disnea, náuseas y vómitos, y podría dañar las funciones hepáticas y renales (Serçinoğlu & Özbek, 2018), así como reacciones alérgicas en algunos consumidores (Cheraghi *et al.*, 2017) mismo efecto que podría desarrollarse al emplear adulterantes ya que no se encuentran especificados en su composición.

La cuantificación es sin duda un proceso que debe llevarse a cabo en cualquier industria alimentaria para asegurar la más alta calidad y la seguridad alimentaria pública, sin embargo, los procesos de cuantificación en la concentración de la misma que se utilizan actualmente, tienden a ser procesos largos y excesivamente costosos, poco amigables con el medio ambiente y con un rango de sensibilidad no tan amplio.

Como consecuencia a estos factores, no todas las industrias cuentan con equipos que permitan el sensado dentro del mismo lugar de producción por lo que son enviadas muestras representativas del lote para su análisis, esto involucra un mayor consumo de tiempo y recursos, lo que puede llegar a retrasar los procesos de producción. En algunos otros lugares no se hacen pruebas específicas de la calidad de la vainillina, ya que se miden otros parámetros de calidad más generales correspondientes al producto final, como pH, consistencia, color, olor y sabor. En estos casos no es posible medir si la concentración de la vainillina es la adecuada, o bien, si ha habido una adulteración.

En este sentido es necesario desarrollar dispositivos para sustancias específicas de amplio uso dentro de la elaboración de alimentos en productos de alta demanda ya que, a partir de ellas, se pueden obtener mejores perfiles de la calidad del producto final y ofrecer una mayor seguridad alimentaria a los consumidores finales. Es importante que estos análisis sean rápidos, seguros y confiables para no sacrificar los tiempos establecidos en las industrias, y que, a su vez, garanticen la seguridad y calidad de sus ingredientes.

Esto vuelve al sensado de la vainillina un área de oportunidad que podría ayudar tanto a la economía nacional e internacional, para disminuir el uso de sustancias adulteradas o falsificadas, como a generar productos de mejor calidad y confiabilidad.

6. Justificación

En consideración a los problemas actuales respecto a la cuantificación de la vainillina y a las áreas de oportunidad de las técnicas de análisis, el desarrollo de un sensor que brinde un mayor rango de sensibilidad, alta especificidad y que permita obtener información acerca de la concentración de la vainillina en menor tiempo, permitiría generar mejores controles de calidad de la materia prima, en el producto a lo largo del proceso, así como de la verificación

de la calidad del producto final, que permita asegurar a las empresas la mejor calidad de sus productos, que al mismo tiempo proveerían de un alto grado de confiabilidad y por otro lado, obtener beneficios colaterales, tal como una reducción en los costos para las industrias alimentarias, específicamente del sector de las bebidas lácteas saborizadas y helados, al abaratar los procesos de análisis y cuantificación, además de reducir los tiempos al ser un análisis rápido en tiempo real.

Los nanomateriales presentan propiedades particulares que permiten desarrollar sensores con propiedades importantes como análisis rápido, sensibles y de un rango de detección apto para concentraciones y variaciones pequeñas.

Las propiedades observadas y estudiadas en la literatura para las nanoestructuras de oro muestran que este elemento presenta una superficie altamente reactiva, lo que le provee de muy buenas propiedades de conducción y a su vez una alta sensibilidad, que podría detectar los cambios de concentración de los productos lácteos saborizados, así como de helados, aun cuando estos cambios llegasen a ser poco significativos. Por otro lado, la mayor rapidez de detección permite abrir nuevas posibilidades, tal como encontrar el punto en el cual la vainillina pueda manifestar una degradación, y con esto, establecer medidas y mejoras dentro de la industria para generar procesos más eficaces en la elaboración de dichos productos.

El uso de nanopartículas de oro presenta múltiples ventajas a los materiales en bulto utilizados para el sensado que podría conferir a las industrias de bebidas lácteas y helados una solución más económica, rápida y precisa que permitirá mejorar los procesos de control de calidad en cuanto a las mediciones de este componente.

Con fines comparativos y a propósito de elegir el material más adecuado para la elaboración de este sensor se evalúa también un compuesto de hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio con nanopartículas de oro soportadas superficialmente (LDH-AuNPs) para observar los cambios que se presentan en cuanto a la sensibilidad de detección al proveer a las nanopartículas de oro de un material de soporte adicional.

Los hidróxidos doble laminares por sí mismos cuentan con características que le permiten ser un buen material de soporte y conducción gracias a su alta capacidad de adsorción, funcionalización, gran estabilidad química y térmica, de síntesis sencilla y económica

(Martínez & Carbajal, 2012), por lo que nos permite cubrir las necesidades que se reconocen dentro de la industria para mejorar los procedimientos de análisis de calidad.

7. Hipótesis

El uso de un compuesto de oro con hidróxidos doble laminares de MgAl permitirá llevar a cabo la detección de vainilla y se podrá desarrollar electrodos sensibles, de rápida respuesta, estables para su aplicación en sensores electroquímicos de vainillina en helados y leches saborizadas.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Sintetizar y evaluar nanopartículas de oro soportadas en hidróxidos doble laminares de MgAl para el desarrollo de electrodos con aplicación en sensores de vainillina en helados de crema y bebidas lácteas saborizadas.

8.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar mediante el método de reducción química nanopartículas de oro y mediante el método de coprecipitación nanopartículas de oro compuestas con hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio.
- Caracterizar las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas de oro compuestas con hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio (LDH-AuNPs) electroquímicamente, mediante voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) y, físicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar los electrodos con las AuNPs y las LDH-AuNPs para la detección de vainillina en soluciones sintéticas en buffer mediante la técnica de voltamperometría

cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) así como la determinación de los límites de detección, la curva de calibración y el factor de correlación.

- Realizar la detección de vainillina en helados de crema y bebidas lácteas saborizadas con concentraciones de vainillina conocidas mediante las técnicas electroquímicas de voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) para la determinación de la curva de calibración, el factor de correlación y la ecuación de diseño del sensor.

9.-Marco teórico

9.1 Vainillina

La vainillina (4-hidroxibenzaldehído) es el compuesto principal de la vainilla, la cual posee su distintivo sabor y aroma (Zheng, 2010). Algunas propiedades importantes de la vainillina están detalladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Identidad química y propiedades fisicoquímicas de la vainillina (Sinha *et al.*, 2008).

Propiedad	Datos
Formula molecular	C ₈ H ₈ O ₃
Numero CAS	121-33-5
Estructura química	(CH ₃ O)C ₆ H ₃ (OH) CHO
Estado físico	Agujas blancas o ligeramente amarillas
Peso molecular	152.15 g/mol
Punto de fusión	80-81°C
Punto de ebullición	285°C
Solubilidad en agua	1g/100 mL
Densidad	1.056 g/mL
Densidad de vapor (aire=1)	5.2
Presión de vapor	2.2 x 10 ⁻³ mmHg (a 25°C)
Punto de inflamabilidad	147°C
Constante de disociación	pKa ₁ =7.40, pKa ₂ =11.4 (a 25°C)

9.2 Vainilla

La vainilla tiene denominación de origen mexicana, ya que esta proviene de la vaina de la orquídea endémica mexicana *vanilla planifolia*, la cual es originaria específicamente de Totonacapan (región norte de Veracruz, México) Actualmente los principales productores son México, Madagascar, Tahití e Indonesia (Cervantes-Castillo, et al., 2018).

En México cerca del 70% de la vainillina es producida en el estado de Veracruz, mientras que los estados de Oaxaca y Puebla producen juntos cerca del 30% restante, mientras que

cantidades más pequeñas son provistas por San Luis Potosí, Hidalgo, Chiapas y Quintana Roo. El aroma de la vainilla mexicana es descrito como intenso, dulce, ligeramente picante con notas de tabaco. La vainilla mexicana es la preferida en los mercados internacionales para usos gourmet y para consumo doméstico por su exquisito sabor y aroma. Se diferencia en su aroma y sabor de otros países por sus compuestos únicos y en el método de curado que recibe (Hernández-Hernández, 2011).

Además de la vainillina, la vainilla natural contiene una gran cantidad de otros compuestos orgánicos. Hasta el momento, se han identificado alrededor de 200 de estos constituyentes, de los cuales solo 26 aparecen en concentraciones superiores a 1 mg / kg. Los constituyentes más importantes son la vainillina (2 – 2.8%), p-hidroxibenzaldehído (~0.2%), ácido vanílico (~0.2%), p-hidroxibenzal-metil-éter (~0.02%) y ácido acético (~0.02%) (Anklam *et al.*, 1997).

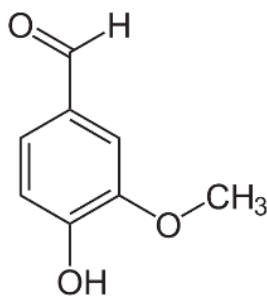


Figura 1. Estructura de la vainillina

9.3 Usos de la vainillina

La vainillina se utiliza en aplicaciones alimentarias, como confitería, panadería, alimentos y bebidas; y no alimentarias, en fragancias, cosmética, aromatizantes y como saborizante en productos farmacéuticos (Walton, *et al.*, 2003). En contraste con la vainillina natural, la composición de la vainilla sintética tiende a ser mucho más simple, ya que consiste en uno o dos componentes principales, usualmente vainillina o etil vainillina (Cheraghi, *et al.*, 2017).

9.4 Interés científico de la vainillina

Dentro del sector de investigación, la vainillina es de interés científico por cuatro razones principales. La primera se refiere a la relación de la vainillina con la vía fenilpropanoide y con los mecanismos de formación de ácidos benzoicos, incluido el ácido 4-hidroxibenzoico y el compuesto de señalización, ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico). En particular, los mecanismos de acortamiento de la cadena de precursores de fenilpropanoides putativos a ácidos benzoicos en plantas han permanecido esquivos durante décadas. La segunda se refiere al estudio de la molécula de la vainillina por sí misma, ya que esta tiene propiedades antioxidantes y antimicrobianas, anticancerígenas y *antisickling*¹ en enfermos de anemia falciforme, lo que lo hace interesante para su estudio (Alpar *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2015). Se ha reportado que la vainillina tiene efectos beneficiosos para la salud, como la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas humanas de baja densidad, lo que lleva a tasas de mortalidad más bajas por enfermedades cardíacas (Bensaid *et al.*, 2002).

Por otro lado, en la actualidad, aproximadamente el 50% de la producción de la vainillina sintética es usada como un intermediario en las industrias químicas y farmacéuticas para la producción de herbicidas, agentes antiespumantes o medicamentos como paverina, l-dopa, l-metildopa y el agente antimicrobiano, trimetoprima. El cuarto interés científico de la vainillina se relaciona con la importancia comercial de la vainillina y con las posibilidades de producir el compuesto (Walton, *et al.*, 2003).

9.5 Obtención de vainillina natural

Debido a la oferta limitada, al elevado precio de la vainilla natural y al predominio de la vainillina sintetizada químicamente, en los años 80 y 90 surgió un incentivo para explorar y desarrollar fuentes biológicas de vainilla y saborizante de tipo vainilla "natural" que podrían comercializarse como una alternativa factible a la sustancia sintetizada químicamente (Walton, 2003). Actualmente hay más interés en la producción de vainillina mediante conversiones biotecnológicas en lugar de la síntesis química. Estos métodos incluyen la producción mediada por tejidos vegetales/cultivos celulares, hongos y transformaciones microbianas de sustratos de biomasa adecuados. Algunos métodos mediante la bioconversión

¹ Prevenir o contrarrestar la formación de células falciformes de los glóbulos rojos (como en la anemia de células falciformes)

parten de precursores naturales como lignina, eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico y estilbenos fenólicos. La biocatálisis de ácido ferúlico se ha vuelto uno de los más estudiados por su baja toxicidad y fácil obtención a partir de materia prima barata de desechos agrícolas (Sinha *et al.*, 2008; L. Zheng *et al.*, 2007). Sin embargo, estos métodos aún se están investigando y no se han adoptado de forma generalizada a nivel comercial (Sinha *et al.* 2008).

Desde la perspectiva del sector económico, la vainillina alcanza un mercado de alrededor de 12000 toneladas por año donde menos del 1% es de origen natural, en gran medida esta cifra es consecuencia de su difícil cultivo. En México existen poco más de mil doscientos productores en casi mil novecientas hectáreas, donde se calcula que cerca de 4000 familias se dedican al cultivo de la vainillina, en su mayoría indígenas, que venden exclusivamente vainilla verde (Hernandez-Hernandez, 2011).

También existen seis empresas privadas y cuatro cooperativas de agricultores que participan en el curado y la venta de vainilla a los mercados nacionales e internacionales. La producción anual en México varía de 80 a 200 toneladas de vainilla verde (10-30 toneladas de vainas de vainilla curadas), dependiendo de las condiciones climáticas y la intensidad de la floración, entre otros factores. En 2008/2009, según estimaciones del Consejo Nacional de Productores de Vainilla, se produjeron 150 toneladas de vainas de vainilla verde (alrededor de 20 toneladas de vainas de vainilla curada) (Hernandez-Hernandez. 2011).

Sin embargo, en un panorama más amplio, se estima que entre 2004 y 2019 el volumen de producción de la vainilla en México disminuyó un 70%, lo cual está principalmente asociado, como en muchas especies de plantas de cítricos frutales, con factores biológicos, nutricionales, climáticos, fisiológicos y genéticos (Hernandez-Hernandez. 2011).

Los vainillales están distribuidos en regiones donde la elevación va de los 61 a los 678m sobre el nivel del mar, con clima semicálido. La precipitación oscila entre 1,540 y 2,740 mm anuales con una temperatura media anual que va de los 22 a 25°C. En esta zona, la planta de vainilla se ha adaptado a las condiciones agroforestales, en donde las especies arbóreas sirven de sostén y sobra para mantener su hábito de crecimiento epífita y su intolerancia a la plena exposición solar (Cervantes-Castillo, *et al.*, 2018).

El aborto de frutos de vainilla se ha asociado al estrés a que es sometida la planta, debido a la frecuencia con la que se presentan temperaturas mayores de 32°C y humedad relativa menor de 80%, condiciones que se han registrado principalmente cuando han existido sequías prolongadas. Dicho estrés climático aparentemente provoca un desbalance hormonal en la planta, disminuyendo aquellas hormonas que favorecen la fijación del fruto, como las auxinas, giberelinas y citocininas e incrementando el etileno y ácido absísico que promueven su abscisión (Hernández-Hernández *et al.*, 2019) por otro lado el hongo *Fusarium Oxysporum* también es un factor importante ya que causa mortalidad y reduce la vida productiva de las áreas cultivadas (vainillales), así como los altos costes de producción y los bajos precios de la vainilla (Hernandez-Hernandez, 2011).

Por otro lado, los motivos políticos, como falta de apoyo a los productores, incentivos al campo y capacitación, así como la falta de esquemas gubernamentales de protección y avance tecnológico, se suman como factores para que existan menos cultivos de vainilla paulatinamente (Luis-Rojas *et al.*, 2020).

9.6 Obtención de vainillina sintética

El resto de vainillina utilizada en la industria se sintetiza mucho más barato a través de procesos químicos o bioquímicos, de los cuales los más importantes son a través de la industria química del guayacol, de la industria del papel a partir de la lignina, y en menor porcentaje partiendo de compuestos como coniferina, eugenol y safrol (Betazzi, *et al.*, 2006).

9.7 Mercado de la vainillina

Actualmente, un litro de extracto de vainillina natural cuesta alrededor de \$1,000 MXN mientras que el litro de extracto de vainillina artificial varía entre \$60 a \$100 MXN. Por otro lado, el kilogramo de vainas de vainilla natural ronda alrededor de los \$1,000 a \$10,000 MXN dependiendo de su tamaño, calidad y origen (Walton, 2013).

Los principales compradores de vainilla mexicana son compañías internacionales como Aust Hatchman, McCormick, Eurovanille, Vanipro, Coca-Cola, Vanilla Saffron Imports,

International Flavor & Fragrances (IFF), Nielsen-Massey Vanilla, y Dammann & Co., entre otras. La mayoría de estos están establecidos en Estados Unidos, Francia, Canadá y Alemania. Dentro de México hay también empresas que compran vainilla para la fabricación de extracto y para su reventa. La mayor parte de la vainilla mexicana es destinada a la exportación, sin embargo, cuando el precio es de menos de \$1000 MXN por kilogramo la vainilla remanente es guardada en almacenes hasta que el precio mejore. El precio de la vainilla curada está establecido por compañías internacionales y es normalmente similar al precio de Madagascar (Hernandez-Hernandez, 2011).

Usualmente México exporta de 20 a 30 toneladas de vainilla curada, cerca del 1% del suministro mundial anual. Estados Unidos es el comprador principal de vainilla mexicana, seguido por Alemania, Francia, Japón y Canadá. Cerca del 5% del suministro de la vainilla mexicana es vendida dentro de México para extractos y para la elaboración de artesanías (Hernandez-Hernandez, 2011).

Hoy en día la vainillina sintética representa más del 90% del mercado de vainilla aromatizante en Estados Unidos, cerca del 50% en el mercado francés, mientras que en México llega a más del 96% (Walton, 2013).

9.8 Fraude y seguridad alimentaria relacionada con la vainillina

La vainillina natural, se considera una de las especias más caras e importantes del mundo, lo que también la ha convertido en una de las diez sustancias más falsificadas. El fraude alimentario consiste en la comercialización de productos con declaraciones manipuladas en la etiqueta o la adición, sustitución, alteración o falsificación deliberada de algún ingrediente por la introducción al mercado de productos sintéticos con sabor y aroma similar al original y a precios más bajos. En el caso de la vainillina esto sucede principalmente mediante la adulteración de la misma a través de compuestos con propiedades organolépticas muy similares a la molécula de la vainillina tales como malto etílico, etil vainillina, maltol y compuestos provenientes de la cumarina sintética (altamente toxica) ya que estas permiten mimetizar el sabor (Sinha, *et al.*, 2008).

Esto impacta directamente en la seguridad alimentaria y en la calidad del producto. Dentro de sus consecuencias, además de traer daños severos a la economía nacional de la vainilla, así como de los extractos obtenidos de manera sintética, la adición de estos adulterantes también puede llegar a producir efectos nocivos en la salud de los consumidores finales, tales como alguna reacción adversa, alergias e interacciones, que, aunado a su amplio uso en todos los rangos de edad, puede tener consecuencias graves para la salud a corto y mediano plazo (Jiang, *et al.*, 2014).

En su contraparte la vainillina sintética, también puede presentar casos de adulteraciones o pequeñas trazas de subproductos, solventes o reactivos al no ser bien purificada. Ambos casos ponen en riesgo la salud de los consumidores, así como la calidad del producto, por lo que resulta necesario impulsar esquemas de procesos de control y calidad de los extractos de vainillina tanto natural como artificial, no solo por seguridad alimentaria, sino también para proteger a los productores al impulsar métodos más rigurosos de control de calidad y reducir la cantidad de productos falsificados en el mercado de vainilla (Jiang, *et al.*, 2014).

9.9 Vainillina en helados

En la industria de alimentos, el 75% de la vainillina se destina a las industrias del chocolate, helado y productos lácteos. Mientras que el 25% restante se usa en la industria de la confitería y pastelería. En 2010 la producción global de helado fue de 16.3 billones de litros, de los cuales, 31% se encontraban en Asia del Pacífico, 29% en América del Norte, 20% en Europa Occidental, 7% en Europa Oriental y 6% en Latinoamérica.

El gasto anual en helado per cápita en dólares estadounidenses por país, proporciona no solo una medida del tamaño del mercado sino también una indicación de la sofisticación de los productos en ese mercado, aunque el costo de vida promedio en estos países también deben tenerse en cuenta. Según esta medida, en 2010 Italia ocupa el primer lugar con \$2287 MXN per cápita, seguida de Australia con \$2084 MXN, Finlandia con \$1781 MXN, Noruega con \$1700 MXN, Suecia con \$1437 MXN y Dinamarca con \$1315 MXN. Estados Unidos tiene \$1012 MXN per cápita, mientras que China tiene \$60 MXN per cápita en gastos de helados (Goff & Hartel, 2013).

Globalmente la distribución de sabores de helado preferidos se encuentra liderada por vainilla, seguido por chocolate, fresa, napolitano y limón, respectivamente. Sin embargo, en la mayoría de formulaciones de helados lácteos, la vainillina constituye un ingrediente base dentro de la formulación. Esto nos permite dimensionar la importancia de la cuantificación de la vainillina al no ser solo uno de los sabores más populares, sino también formar parte importante de las formulaciones de otros productos lácteos, como bebidas lácteas saborizadas y helados de diferentes sabores, dirigidos al público en general con un alto grado de consumo (Goff & Hartel, 2013).

9.10 Factores a considerar en la cuantificación de la vainillina

Para cuantificar la vainillina es importante conocer la etapa en la que esta se integra al helado. El proceso de fabricación del helado se muestra en la figura 5. Este comienza con el procesamiento de la formulación de helado base, primero mediante una pasteurización y homogeneización de los ingredientes, posteriormente se enfría y se deja envejecer al menos 4 horas, posteriormente se mezclan a fondo los saborizantes y edulcorantes justo antes del congelamiento, el mezclado y la incorporación de aire (Goff & Hartel, 2013).

En este sentido podemos asumir que la incorporación de vainilla ocurre después de los cambios bruscos de temperatura ocurridos durante la pasteurización, por lo que para esta investigación se considera siempre una temperatura de 4°C para el caso de los helados, mientras que para las bebidas lácteas saborizadas de 25°C (temperatura ambiente). También es posible asumir que el pH se mantiene constante ya que la incorporación de todos los ingredientes que podrían alterarlo ocurre antes de la adición de la vainillina.

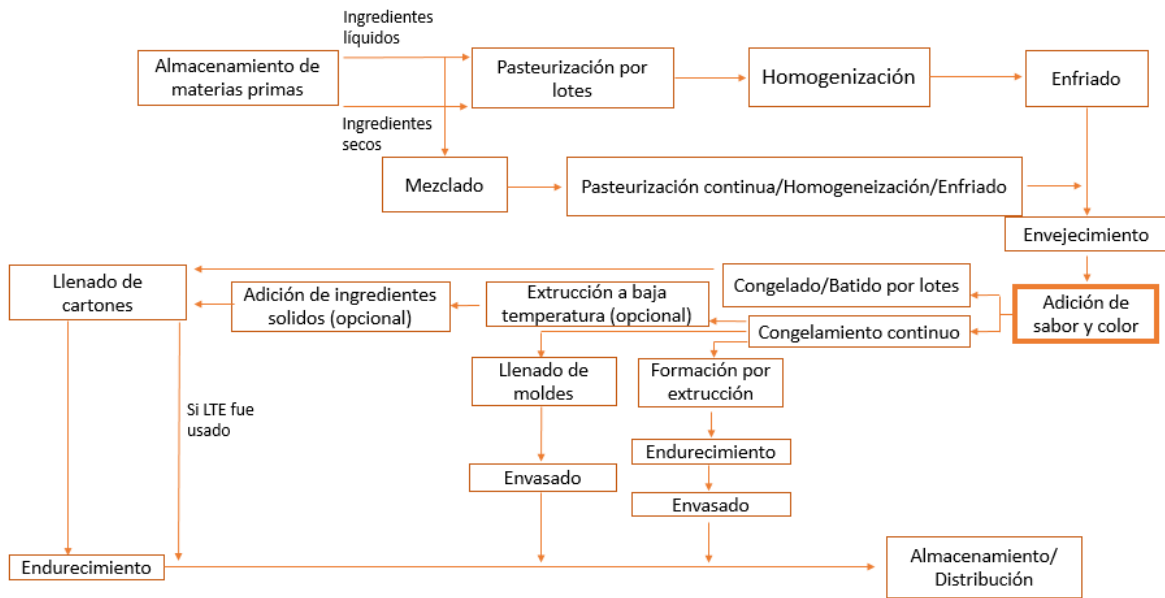


Figura 2. Diagrama esquemático de la producción de helados de crema (Goff & Hartel, 2013).

Cabe señalar que la cantidad de saborizantes utilizada depende de la composición e ingredientes de la mezcla. La cantidad de vainillina debe aumentarse a medida que se incrementa la concentración de grasa láctea y el contenido de sólidos lácteos no grasos. Cuando la concentración de edulcorante es baja, hay que aumentar la cantidad de vainilla, pero a intensidades altas de dulzor, las variaciones en la cantidad de vainilla marcan diferencias comparativamente pequeñas en la preferencia del consumidor. La mezcla preferida de vainilla varía con el contenido de grasa. Es importante señalar también que el pH del helado varía por el sabor, ingredientes y contenido de grasas, tendiendo a ser ligeramente ácido en las formulaciones estándar con un pH promedio de 6.5 (Goff & Hartel, 2013).

Específicamente dentro de productos de pastelería, helados de crema y bebidas lácteas las concentraciones estandarizadas se encuentran en 3.3mM (Ohmes, 1998) para el caso de la vainillina sintética, mientras que para capsulas de vainilla o extractos naturales de vainilla es de 0.6mM (Anklam, *et al.* 1997).

9.11 Efectos de una concentración diferente de vainillina

Es importante cuantificar la cantidad de vainillina en el producto final, ya que se ha reportado que la vainillina puede ser oxidada a ácido vanílico ante cambios de temperatura, cuyo proceso puede ser más rápido si se trata de vainillina natural. Por otro lado, se ha reportado la dependencia de la oxidación de la vainillina con respecto a la variación del pH. Se ha observado que, a pH más bajos, como 3.5 y 4, no se forma ácido vanílico, y la cantidad de vainillina se mantiene. Sin embargo, la degradación de la vainillina y la formación de ácido vanílico pueden observarse por encima de un pH 4 en muestras de leche pasteurizada. En valores de pH de 6 a 8 solo se observan cantidades mínimas de ácido vanílico en crema. A valores de pH más altos (arriba de 8) la vainillina vuelve a presentar estabilidad en la leche pasteurizada (Anklam, et al., 1997).

Esto puede traer cambios en cuanto al sabor y calidad del producto, por lo tanto, la concentración de vainillina debe mantenerse dentro del rango de lo ideal de acuerdo a los estándares de calidad (Anklam et al., 1997). En el caso de presentar un exceso de vainillina existen afectaciones al consumidor como dolores de cabeza, náuseas, vómitos e incluso puede afectar las funciones del hígado y del riñón (Vilian et al., 2016), por lo que, de acuerdo con the Food and Agriculture Organization (FAO), la ingesta diaria de vainillina debe ser menor de 10 mg kg^{-1} . En su contraparte, una baja concentración de vainillina denota una mala calidad del producto (Vilian et al., 2016).

9.12 Cuantificación tradicional de vainillina dentro de la industria

Dentro de la industria, el tiempo y costo de los procesos marcan un eje central, por lo que es necesario métodos asequibles, selectivos, sensibles, simples y de rápida detección para monitorear la concentración de la vainillina real, determinar si se ha sufrido alguna degradación o bien, algún tipo de adulteración (Ziyatdinova, 2018).

Hasta ahora, se han desarrollado varios métodos de detección de vainillina, como cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gases, electroforesis capilar y espectrofotometría UV, con los cuales se consiguen buenos resultados de cuantificación debido a que pueden detectar concentraciones muy bajas, sin embargo, muchos de estos

métodos generalmente involucran un considerable uso de solventes orgánicos, lo que resulta en un proceso poco amigable con el medio ambiente, por otro lado el uso de equipo de grandes dimensiones y de alto costo comparado con los métodos electroanalíticos resulta en una desventaja (Zhang, 2011; Silva *et al.*, 2015). Como resultado la frecuencia de análisis tiende a reducirse, ya que en algunos casos el lugar donde se fabrican estos productos no tiene el equipo necesario para su cuantificación, por lo que es necesario considerar que las muestras a analizar deben ser transportadas a un laboratorio para realizar análisis, lo que puede ser muy costoso e involucrar consumo de tiempo (Baez-Gaxiola, 2017).

En este sentido se han propuesto muchas soluciones como la elección de un potencial anódico, electrolitos de soporte, nuevos materiales para electrodos o electrodos modificados (Zhang *et al.*, 2011).

9.13 Sensores

El sensado es fundamental y un elemento principal de cualquier sistema de control y medición, cuya función básica es medir el cambio en una propiedad o el cambio en el estado del analito. Dicho sistema emplea el elemento de sensado, mediante interacción química o física con el analito y el entorno de la atmosfera, lo cual causa la interrupción o iniciación de una señal. Es entonces seguido por el uso de un elemento de transducción para convertir una señal física o química media en un parámetro relativo que puede ser después convertido usando algún tipo de convertidor, para, finalmente, obtener información de salida que nos permita describir al analito (Paladiya & Kiani, 2018).

Actualmente, los sensores están siendo utilizados en la gran mayoría de las industrias (aeronáuticas, electrónicas, de agricultura, biomédicas, de alimentos, etc.) para la automatización y los procesos de control. Por otra parte, es lógico clasificar los sensores basándonos en el tipo de estímulo de la señal de entrada, que nos puede indicar una medición en cuanto a la calidad o cantidad del analito de interés. Estas interacciones primarias cambian el estado o la propiedad del analito, que puede ser mediante radiación, mecánica, eléctrica, termal, magnética, química o una combinación de ellas. (Paladiya & Kiani, 2018).

De esta manera, el cambio en cualquiera de estas propiedades puede indicarnos una propiedad de manera directa o indirecta que puede ser medible mediante un transductor. Por otro lado, la precisión del sensado puede ser alterado positivamente por el cambio de las características de la superficie (Paladiya & Kiani, 2018).

9.14 Sensores químicos

En la figura 6 se muestra la estructura básica del sensor químico donde hay dos unidades funcionales: el transductor y el receptor. El transductor es un dispositivo analito que proporciona una energía de salida que tiene una determinada relación con la energía de entrada. En este sentido, el transductor recibe la información química del receptor y la transforma en una señal eléctrica medible. Los transductores se pueden clasificar según su principio de operación, pueden ser ópticos, electroquímicos, eléctricos, sensibles a masa, magnéticos y termométricos. En este caso, se tratará de un sensor electroquímico. El receptor es el componente del sensor químico que se encuentra en contacto directo con el analito e interactúa con él, en este caso el disco de carbón vítreo que puede o no estar revestido con la deposición de algún material para mejorar sus propiedades (Baez-Gaxiola, 2017).

Esta interacción genera una información química que es transmitida hacia el transductor, el cual está en contacto directo con el receptor (Baez-Gaxiola, 2017).

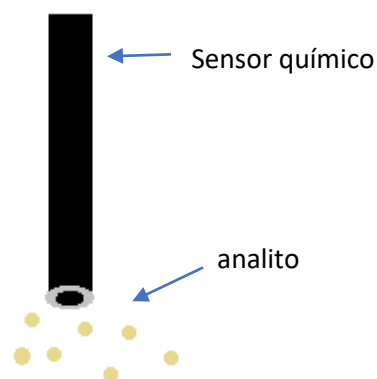


Figura 3. Estructura básica de un sensor químico

El principio de operación de los sensores químicos basados en transducción electroquímica es la conversión del resultado de una reacción electroquímica, la que sucede entre el analito

y el receptor en una señal medible. En este tipo de sensor se requiere la aplicación de un potencial eléctrico controlado para inducir la reacción de oxidación. En este caso se obtiene una señal de corriente por medio de la variación del potencial del sistema (Baez-Gaxiola, 2017), esta señal de corriente nos permite medir la concentración de analito ya que varía en función de la concentración de la misma.

9.15 Sensores electroquímicos

Para llevar a cabo este tipo de técnica, se requiere una celda electroquímica, la cual se define como un dispositivo donde se producen corrientes eléctricas como resultado de una reacción de óxido-reducción. En la figura 7 se muestra una representación gráfica de una celda electroquímica típica, la cual tiene una configuración de tres electrodos: de trabajo, de referencia y auxiliar. Los primeros dos representan al ánodo de la celda, mientras que el electrodo auxiliar representa al cátodo (Malkov, 2009).

El electrodo en color negro, es el electrodo de trabajo es donde se lleva a cabo el proceso de oxidación-reducción, por lo que es el electrodo que realiza la función de sensado, asistido por los electrodos consiguientes. El electrodo auxiliar que en la representación se muestra como el electrodo gris oscuro, asiste el flujo de corriente (I) a través de la celda. La corriente producida por la reacción ocurrida en el electrodo de trabajo viaja a través del electrodo auxiliar hasta el potencióstato. Por último, el electrodo de referencia, que gráficamente es el electrodo gris claro, se encarga de mantener el potencial (V) constante ante los cambios de condiciones experimentales. Así, el potencial del electrodo de trabajo siempre referencia contra el potencial de este electrodo.

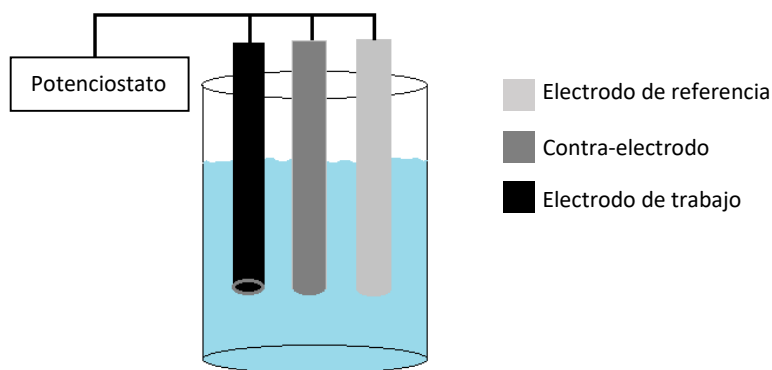


Figura 4. Celda electroquímica conectada a un potencióstato para la obtención de información de la muestra.

A través del funcionamiento de esta configuración de celda electroquímica podemos llevar a cabo análisis de voltamperometría cíclica (CV, por sus siglas en inglés), la cual consiste en la exploración del potencial de un electrodo sumergido inmóvil desde su potencial inicial predeterminado en un valor final y luego se obtiene el análisis inverso.

La CV es una técnica utilizada para el estudio de una amplia gama de propiedades electroquímicas de un analito o un sistema. Los experimentos de voltamperometría se realizan aplicando un barrido de potencial a un sistema electroquímico y luego medir la corriente resultante. La curva resultante aplicando un potencial contra una corriente se llama voltamperogramas y una vez que el barrido lineal de potencial alcanza su valor determinado, es aumentado en la dirección opuesta hacia el potencial inicial. Los voltamperogramas muestran específicamente las señales correspondientes a ciertas propiedades del analito, tales como la oxidación-reducción o potencial redox. (JoVE Science Education Database, 2020).

Los sensores electroquímicos son una combinación de sensores eléctricos y químicos que tienen ventajas como bajo costo de construcción y operación, análisis rápido y sensibilidad. Debido a la simplicidad, portabilidad, bajo costo y análisis rápido, la electroquímica representa una alternativa para la detección de vainillina mejorada (Li, 2017). La vainillina es un compuesto electroactivo y por lo tanto es posible cuantificarla a través del estudio de su oxidación. Sin embargo, la detección en el electrodo desnudo tiene un sobrepotencial relativamente alto y la interferencia conduce a que su selectividad y sensibilidad no sean lo suficientemente buenas. Para mejorar la selectividad y la sensibilidad deficientes, se han estudiado diferentes tipos de electrodos modificados (Wang, 2015).

9.16 Implementación de la nanotecnología en el sensado

Se define como nanopartícula a cualquier partícula cuyo tamaño se encuentra en un rango entre 1-100 nm. Cuando la materia se reduce a la nanoescala tiende a poseer propiedades físicas únicas diferentes a su contraparte bulk. Estas propiedades físicas son en gran parte derivadas de su tamaño, forma y naturaleza del entorno de las partículas (Shah, *et al.*, 2014).

Los nanomateriales pueden mejorar la transferencia interfacial electrónica por lo que pueden ser usados para modificar los electrodos, tales como nanomateriales de carbón o

nanopartículas metálicas. Estos últimos en particular presentan propiedades superiores a su contraparte en bulto, por lo que se vuelven especialmente atractivas para el desarrollo de sensores ya que tienen una alta capacidad de transferencia de carga, esta característica los hace adecuados para lograr una mayor sensibilidad y límites de detección más bajos (Silva et al., 2015), además tienen una buena selectividad, un alta actividad catalítica y una mejor resistencia a la desactivación (Li *et al.*, 2017; Ying *et al.*, 2018).

9.17 Nanopartículas de oro

Dentro de la clasificación de partículas del tamaño nanométrico, o nanopartículas, de metales nobles, las nanopartículas de oro (AuNPs, por sus siglas en inglés) reciben especial interés debido a sus propiedades particulares eléctricas, ópticas y termales, además de una amplia relación de volumen-superficie, una alta actividad de superficie, pequeño tamaño de partícula y buenas propiedades de superficie, así como propiedades catalíticas únicas (Silva et al., 2015). Una de las características más destacables es la alta energía superficial de las nanopartículas de oro, lo que las hace extremadamente reactivos y a su vez, provoca que en la mayoría de los casos se agreguen cuando estos se encuentran sin protección o pasivación de la superficie. (Guo & Wang, 2007). Para evitar la agregación y generar una mejor dispersión de las AuNPs se emplea Nafion®, que además provee de una mejora en cuanto a la cantidad de sitios activos para el sensado (Cao et al., 2015).

Dentro de las características principales del Nafion® se encuentran que se trata del primero de una clasificación de electrolitos poliméricos llamados ionómeros. El Nafion® destaca especialmente por su excelente estabilidad tanto térmica como mecánica y, por otro lado, posee muy buenas propiedades conductoras (Mirsky & Yatsimirsky, n.d.). El uso de electrodos de carbón vítreo modificados con Nafion® como sustrato de electrodo está bien establecido, principalmente debido a su buena capacidad de intercambio de cationes y su estabilidad, así como a la fuerte capacidad de absorción del Nafion®, por lo cual es ampliamente utilizado en electrocatálisis (Zhang, *et al.*, 2011).

Gracias a todas las propiedades de las nanopartículas de oro, este material se ha usado ampliamente para el desarrollo de múltiples sensores ya sean biosensores, para aplicaciones

electroquímicas como bioensayos, sensores químicos y electrocatálisis. Dentro de las aplicaciones electroquímicas destacan los nanosensores electroquímicos amperométricos y voltamperométricos. Se han estudiado también diversos métodos para la elaboración de sensores utilizando nanopartículas de oro, como la deposición electroquímica, el anclaje por interacción electrostática, enlace covalente, drop casting, entre otras (Guo & Wang, 2007).

El funcionamiento propuesto del sensor se muestra en la Figura 8. En (A) se deposita la tinta AuNP-Nafion® sobre la superficie del electrodo de trabajo mediante la técnica de drop casting. Posteriormente, se coloca el electrodo con la tinta depositada dentro de la muestra a analizar, junto con el contra electrodo y el electrodo de referencia para llevar a cabo la experimentación mediante voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV). La reacción electroquímica de oxidación llevada a cabo en la superficie del sensor se muestra en la Figura 8 (B), que, como consecuencia, se obtiene un pico de corriente en el voltamperograma el cual será usado en la determinación de la concentración de la vainillina.

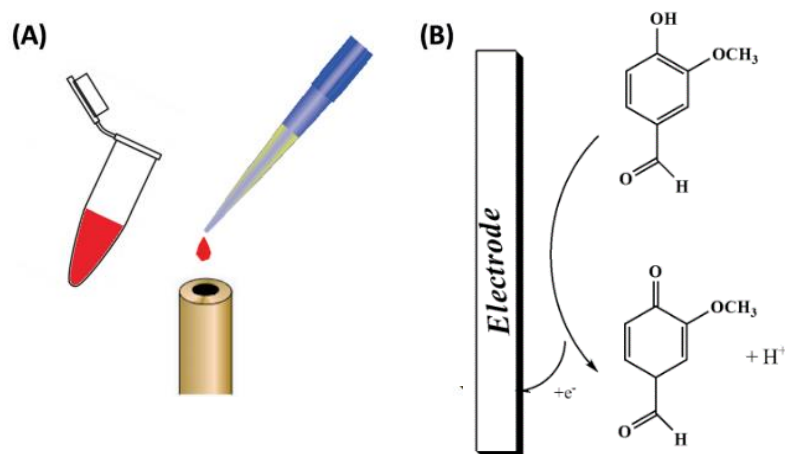


Figura 5. (A) Deposición de la tinta de AuNP en el electrodo para la construcción del sensor (Silva et al., 2015) y (B) propuesta de reacción electroquímica involucrada en la detección de la vainillina (Cheraghi *et. al.*, 2017)

9.18 Nanopartículas de oro soportadas en hidróxidos doble laminares

Los hidróxidos dobles laminares (LDH) tienen muchas aplicaciones en la catálisis heterogénea como catalizador o precursor de catalizador. Estos son conocidos como arcillas

aniónicas o como compuestos tipo hidrotalcita porque estructuralmente son muy similares a la brucita, donde el magnesio está rodeado de forma octaédrica por seis átomos de oxígeno en forma de hidróxido. Las capas se forman compartiendo los bordes de las unidades octaédricas adyacentes, creando laminas bidimensionales que se apilan para formar estructuras tridimensionales mediante enlaces de hidrógeno (Silva, *et al.*, 2013).

Como resultado, dichos materiales disponen de propiedades físicas y químicas únicas, como lo es la habilidad de adsorber iones en su interfaz. Los LDHs son una de las familias de arcillas más llamativas, gracias a su alta capacidad de adsorción, funcionalización, gran estabilidad química y térmica, de síntesis sencilla y económica, así como excelente biocompatibilidad (Martinez & Carbajal, 2012).

Las nanopartículas de oro presentan un excelente desempeño catalítico, como la oxidación electrocatalítica y su alta área superficial reactiva (Silva, *et al.*, 2015) lo que las hace extremadamente reactivas a cambios eléctricos, por lo que es un excelente material para el desarrollo de sensores electroquímicos (Cuo & Wang, 2007). A su vez, presentan una gran relación volumen-superficie lo que permite mejorar la cantidad de sitios activos para el sensado.

Una de las formas propuestas para obtener nanopartículas de oro (AuNPs) es mediante la formación de hidróxidos doble laminares (LDHs), ya que mediante este método no solo se obtienen nanopartículas de oro dispersas sobre este material, sino también representa un método de obtención sin el uso de agentes reductores (Silva, *et al.*, 2013). Muchos reactivos pueden actuar como agentes reductores para la formación de nanopartículas de oro, como ciclodextrinas, citrato de sodio, sulfato de hidracina y borohidruro de sodio. Sin embargo, obtener nanopartículas en la ausencia de estos reactivos puede reducir los costos de los procesos y ser amigable con el medio ambiente (Silva, *et al.*, 2013).

En la figura 9 se muestra una propuesta del mecanismo de formación de las nanopartículas de oro soportadas en el LDH en el cual se sugiere que la N-N-dimetilformamida, además de ser el disolvente, es también el agente reductor en un proceso redox mediado por el LDH (Silva *et al.*, 2013).

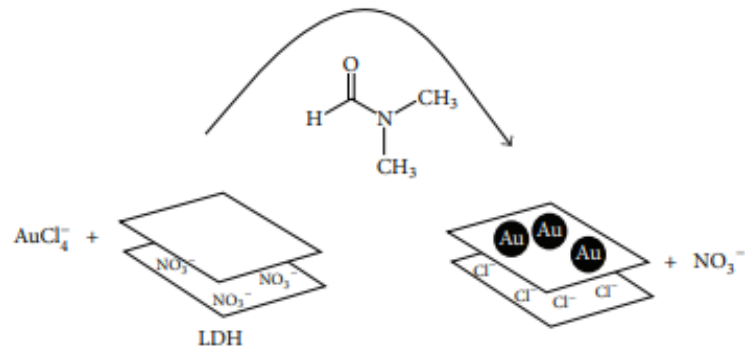


Figura 6. Posible método de formación de nanopartículas de oro mediante la formación de LDH con N, N – dimetilformamida (Silva, et al. 2013).

En este trabajo se propone evaluar las nanopartículas de oro soportadas en el LDH obtenidas por Silva, et al. 2013 para la detección y cuantificación de vainillina. Además, se plantea la misma evaluación y estudio para las nanopartículas de oro (AuNP) únicamente soportadas en carbón vulcan y Nafion®. Con este trabajo presentamos buscamos tener un impacto significativo en el desarrollo de un sensor electroquímico que permita garantizar la calidad y control de los procesos en la elaboración de bebidas lácteas saborizadas y helados saborizados con extractos de vainillina (natural o sintética), dando una determinación más rápida, altamente sensible y menos costosa comparada con las técnicas de análisis que se utilizan en la actualidad (Guo & Wang, 2007).

10.-Metodología

10.1 Síntesis de las AuNPs

La síntesis de nanopartículas de oro se realizó por reducción química en presencia de NaBH_4 (99%, Aldrich) que actuó como agente reductor. Como agente de transferencia de fase, se añadió una solución acuosa 0.31mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al bromuro de tetraoctilamonio (TOAB, 98% Fluka) en tolueno (99,98% Aldrich). A esta solución se le añadió dodecanotiol (98%, Aldrich), seguido de la adición de NaBH_4 en exceso. La reacción se mantuvo bajo agitación constante a 2°C durante 2,5 h.

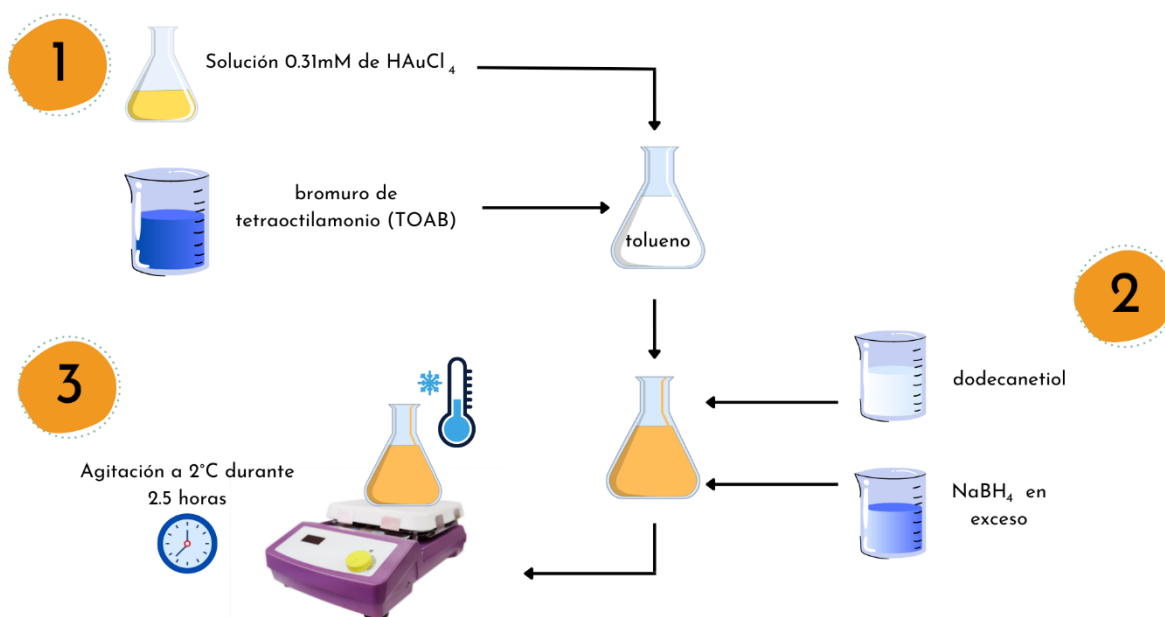


Figura 7. Modelo esquemático de la síntesis de AuNPs por reducción química (parte 1 de 2; Cuevas-Muñiz, et al., 2011).

Una vez realizado el proceso anterior, se separó el sólido obtenido y se lavó con una cantidad considerable de etanol (J.T. Baker), lo que permitió la purificación del material resultante. Las nanopartículas obtenidas se dispersaron en hexano (99,7%, J.T. Baker) por el método de impregnación en Vulcan XC-72 en proporción 30:70 (p/p). Posteriormente, se realizó un tratamiento térmico a 300°C durante 3 h (Cuevas-Muñiz, *et al.*, 2011).

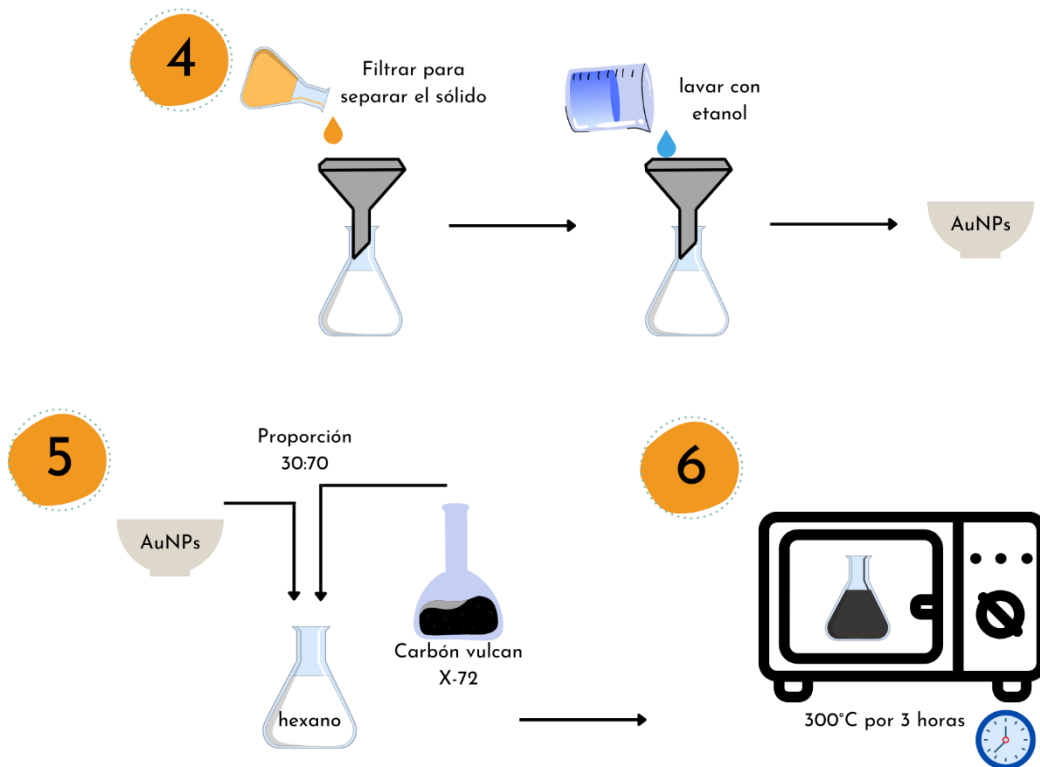


Figura 8. Modelo esquemático de la síntesis de AuNPs por reducción química (parte 2 de 2; Cuevas-Muñiz, et al., 2011).

10.2 Síntesis del LDH-AuNPs

Todas las sustancias utilizadas fueron sustancias de grado reactivo o analítico y se utilizaron sin purificación adicional. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada. Los hidróxidos doble laminares de Mg/Al fueron obtenidos usando una solución que contenía 0.006 mol de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) y 0.003 mol de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, 99%) ($\text{Mg}(\text{II})/\text{Al}(\text{III})=2$) en 100mL de agua destilada.

Se preparó el LDH bajo agitación vigorosa por coprecipitación constante a $\text{pH}=10$ durante 19h. Se ajustó el pH con una solución de $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH (98%, Macron) a temperatura ambiente.

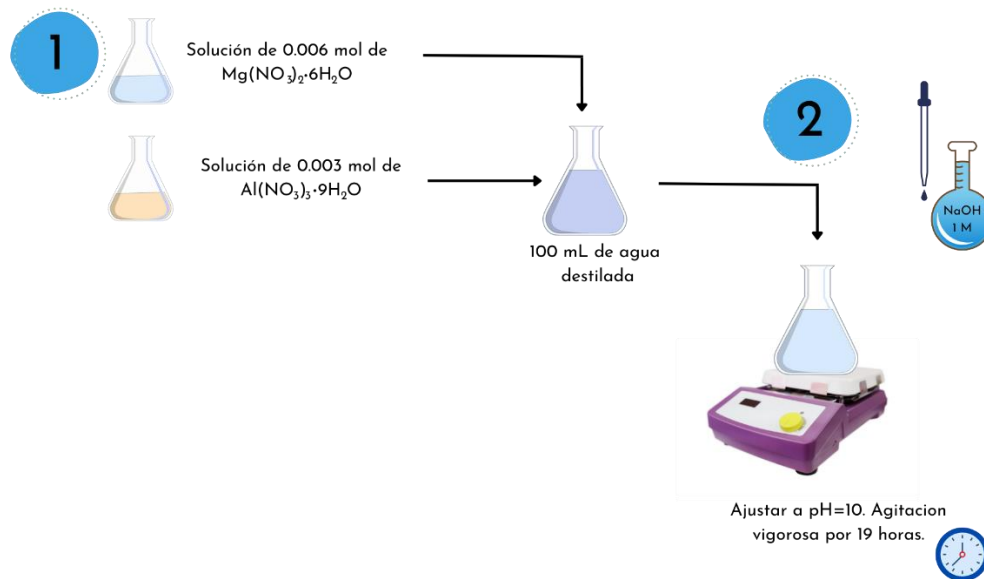
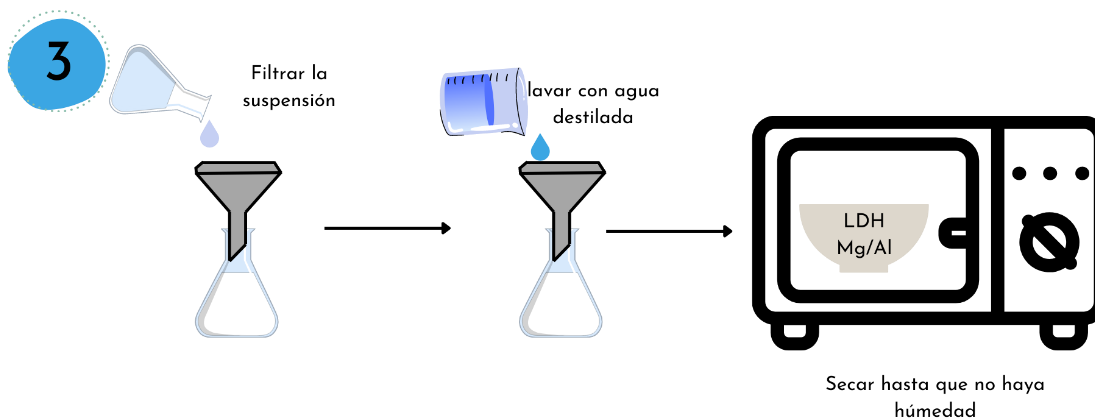


Figura 9. Modelo esquemático de la síntesis de LDH-AuNPs por el método de coprecipitación (parte 1 de 3; Silva, et al., 2013).

La suspensión obtenida fue filtrada para retirar el sobrenadante y posteriormente se realizó un lavado con agua destilada. El material se dejó secar y posteriormente se agregó a una solución de $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{AuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99%) en N,N dimetilformamida (DMF) (Aldrich, 99%) (Au:LDH; 1:4) a 80°C durante 24h.



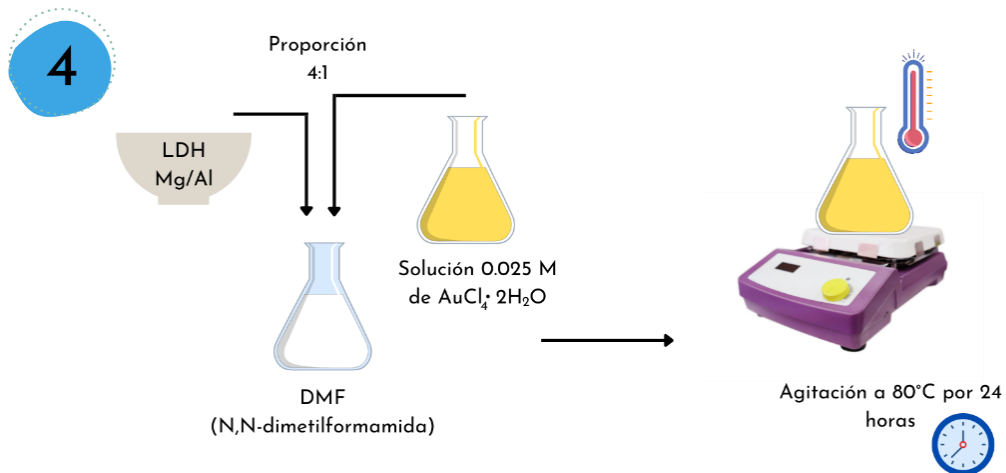


Figura 10. Modelo esquemático de la síntesis de LDH-AuNPs por el método de coprecipitación (parte 2 de 3; Silva, et al., 2013).

El sólido ligeramente morado se filtró y se lavó con DMF, posteriormente se dejó secar a 50°C . (Silva, et al., 2013).

Cambios observados en la reacción

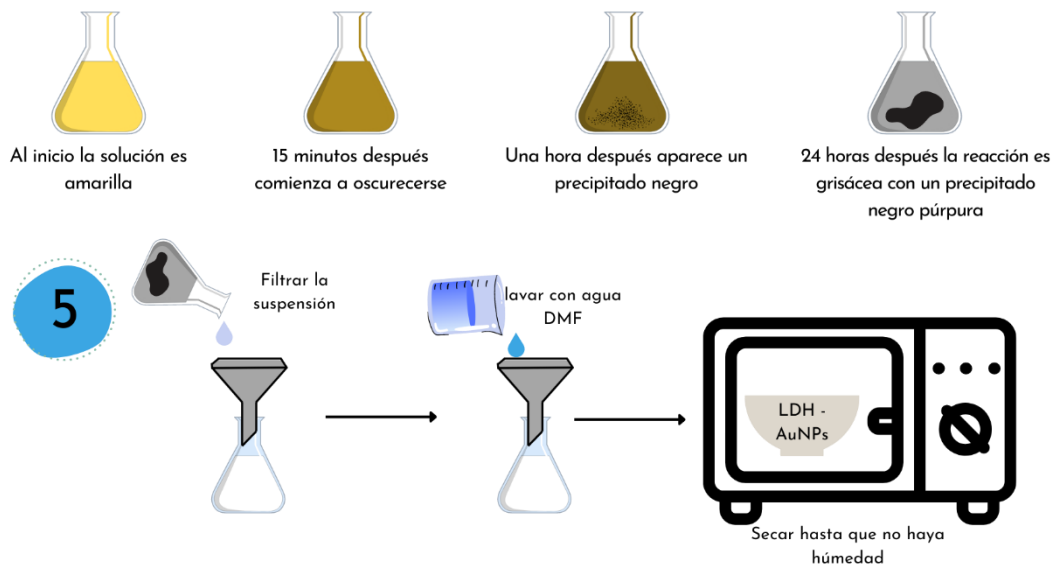


Figura 11. Modelo esquemático de la síntesis de LDH-AuNPs por el método de coprecipitación (parte 3 de 3; Silva, et al., 2013).

10.3 Reactivos y Equipo

Los ensayos electroquímicos se realizaron en una celda convencional de tres electrodos. Se utilizó KCl como electrodo de referencia. Como electrodo auxiliar se utilizó una varilla de grafito y como electrodo de trabajo una varilla de carbón vítreo modificada, primero con la tinta de AuNP, posteriormente con la tinta de LDH-AuNP. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C. Se utilizó un potenciostato/galvanostato/ZRA de Gamry Instruments 3000 para realizar voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Esto permite determinar si el material es adecuado para su aplicación como sensor. Las soluciones de vainillina se prepararon en una solución buffer de fosfato 0,01M pH 6,5 (Cuevas-Muñiz, *et al.*, 2011). De esta manera se determinaron los límites de detección, se realizaron las pruebas de interferentes y se determinó que el material es el adecuado para ser aplicado como sensor electroquímico.

10.4 Preparación de tinta a) AuNP/carbón vulcan - Nafion

La tinta se preparó dispersando las AuNP en alcohol isopropílico y Nafion al 5% en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Para la preparación de la tinta se utilizó 120 μL de alcohol isopropílico y 14 μL de Nafion al 5% por cada miligramo de AuNP (Cuevas-Muñiz, *et al.*, 2011).

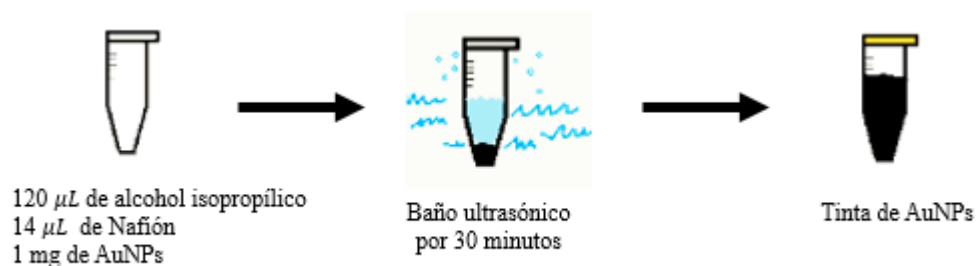


Figura 12. Síntesis de tinta AuNPs/carbón vulcan – Nafion (Cuevas-Muñiz, *et al.*, 2011).

10.5 Preparación de la tinta b) LDH-AuNP/Carbón Vulcan - Nafion

Se dispersó 1 mg de LDH-AuNP en 120 μL de alcohol isopropílico y 14 μL de Nafion® en baño ultrasónico durante 30 minutos. Se obtuvo una tinta ligeramente morada. Posteriormente se tomó una alícuota de 10 μL y se dispersó en una tinta de carbón vulcan durante 30 minutos para llevar a cabo la impregnación con el material LDH-AuNPs. La tinta de carbón vulcan se preparó con 1 mg de material en 120 μL de alcohol isopropílico y 14 μL de Nafion en baño ultrasónico durante 30 minutos.

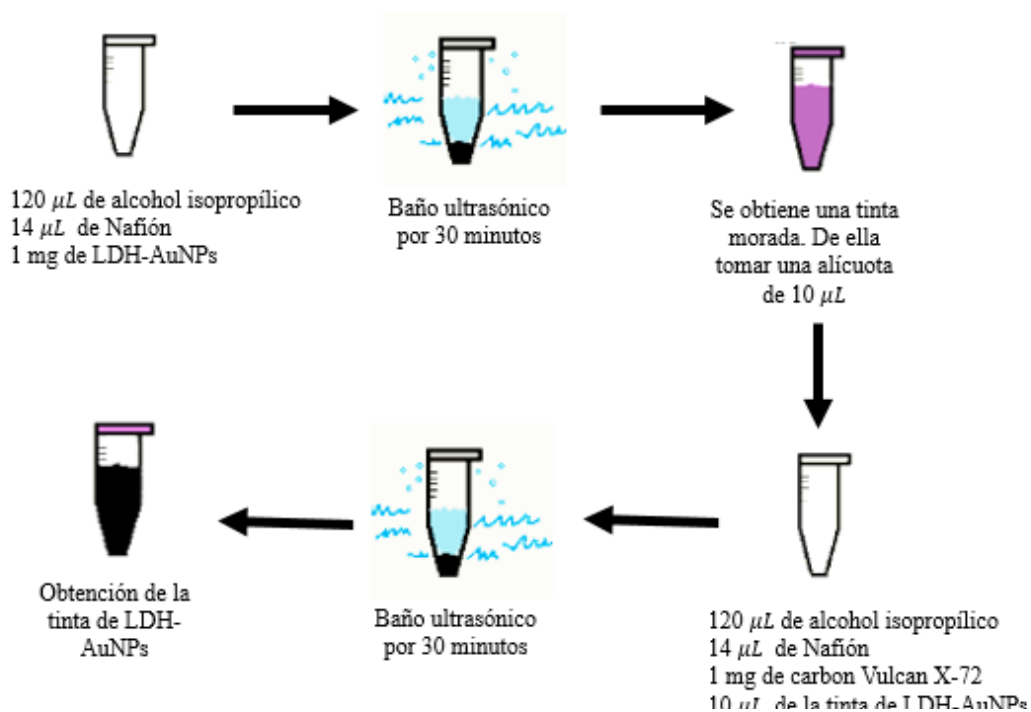


Figura 13. Síntesis de tinta LDH-AuNPs/carbón vulcan – Nafion (Cuevas-Muñiz, et al., 2011).

10.6 Preparación del sensor de vainillina

Para el estudio de la detección de la vainillina, la tinta a) AuNP/carbón vulcan - Nafion® y b) LDH-AuNP/carbón vulcan - Nafion® fueron, cada una respectivamente, depositadas sobre un sustrato conductor, en este caso, se utilizó un disco de carbono vítreo, que fue pulido con alúmina. Sobre él se depositaron 2,0 μL de la tinta de a) AuNP/carbón vulcan - Nafion y b) LDH-AuNP/carbón vulcan - Nafion®, respectivamente preparadas. Una vez seca la tinta, se introdujo el electrodo de trabajo con la tinta en la celda para su evaluación electroquímica.

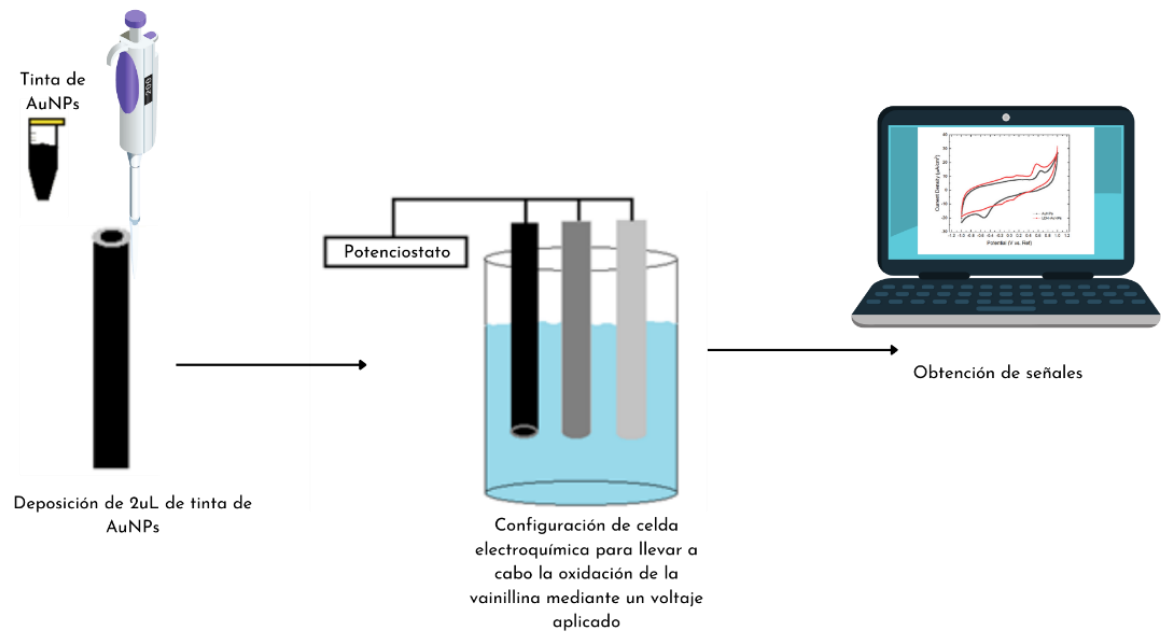


Figura 14. Proceso de detección electroquímica de la vainillina en solución muestra usando un electrodo recubierto con las tintas a) AuNP/carbón vulcan - nafion y b) LDH-AuNP/carbón vulcan - Nafion.

11.- Resultados y Discusión

11.1 Caracterizaciones fisicoquímicas

11.1.1 Microscopia UV-vis

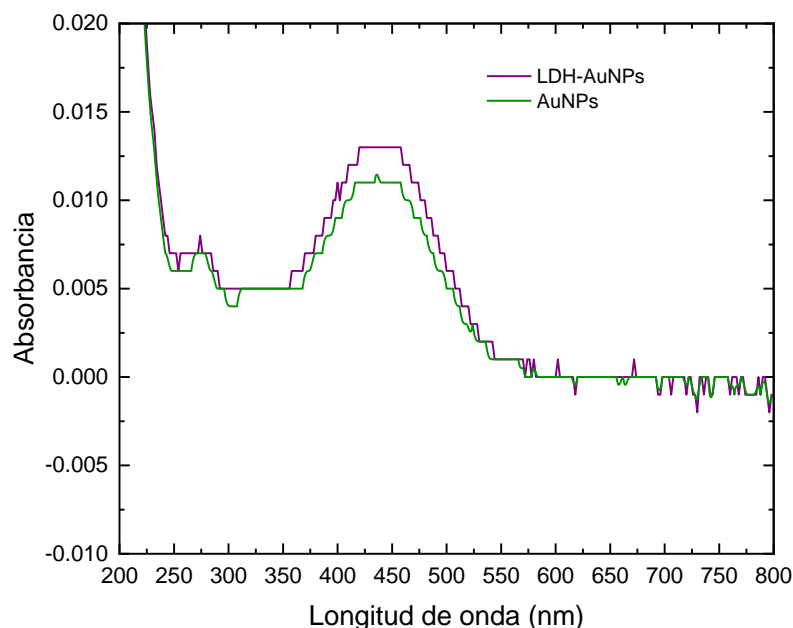


Figura 15. Espectro UV-vis para las AuNP/carbón vulcan y LDH-AuNPs.

Las propiedades ópticas de las AuNPs pueden ser fácilmente investigadas mediante espectroscopia de UV-vis (Leifert, et al., 2013). En la figura 15 se ilustra el espectro UV-vis obtenido tanto para las AuNPs/carbón vulcan como para el material compuesto de los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio con las AuNPs (LDH-AuNPs) donde para ambos materiales el pico de absorbancia aparece a una longitud de onda de 436.09 nm; para el caso de las AuNPs soportadas en los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio (LDH-AuNPs) se tiene una señal de absorbancia de 0.013, la cual tiene una mayor intensidad comparada con el pico de absorbancia que se tiene únicamente con las AuNPs/carbón vulcan, cuyo pico de absorbancia es de 0.011. Habitualmente el pico de absorbancia para las AuNPs, de acuerdo a la literatura, se encuentra alrededor de los 518 nm (Hou, et. al., 2015), que se atribuye a la susceptible absorción de ondas electromagnéticas en

el espectro cercano al rango visible como consecuencia de la banda de resonancia plasmónica superficial de las AuNPs (Das, et. al., 2012).

El espectro se mantiene alrededor de los 500 nm cuando se trata de oro nanométrico con un tamaño de partícula de alrededor de 30 – 60 nm (Hong&Li, 2013), sin algún material de soporte o conjugación, sin embargo, al encontrarse unido a algún material de soporte el pico de absorbancia puede presentar desplazamiento como resultado de la interacción de las AuNP con el material de soporte (Hou, et. al., 2015).

La posible correlación del desplazamiento podría estar vinculada con dos factores, donde el primero puede deberse a la tasa de nanopartículas de oro con respecto al material de soporte, de forma que al incrementar el porcentaje de este último se tiene un mayor desplazamiento a longitudes de onda más cortas (Cvak, et al., 2012; Mei et. al., 2012). Con ello podríamos suponer que el corrimiento a longitudes de onda más cortas podría estar asociado a la presencia de carbón vulcan como material de soporte y, y en el caso del material que compone los hidróxidos doble laminares estos también podrían contribuir. En ambos casos al tener la máxima absorción a la misma longitud de onda, podemos suponer que la concentración de AuNPs en relación a su material de soporte es bastante similar en los dos materiales.

Por otro lado, la segunda posible correlación podría deberse al tamaño de partícula del oro nanométrico, donde a menores tamaños de partícula la longitud de onda donde se alcanza el máximo de absorción disminuye en la misma proporción (Hong&Li, 2013) y, al tener un tamaño de partícula menor 30 nm, la longitud de onda también en la que se presenta el pico de absorbancia también disminuye.

11.1.2 Microscopia SEM para las AuNPs/carbón vulcan

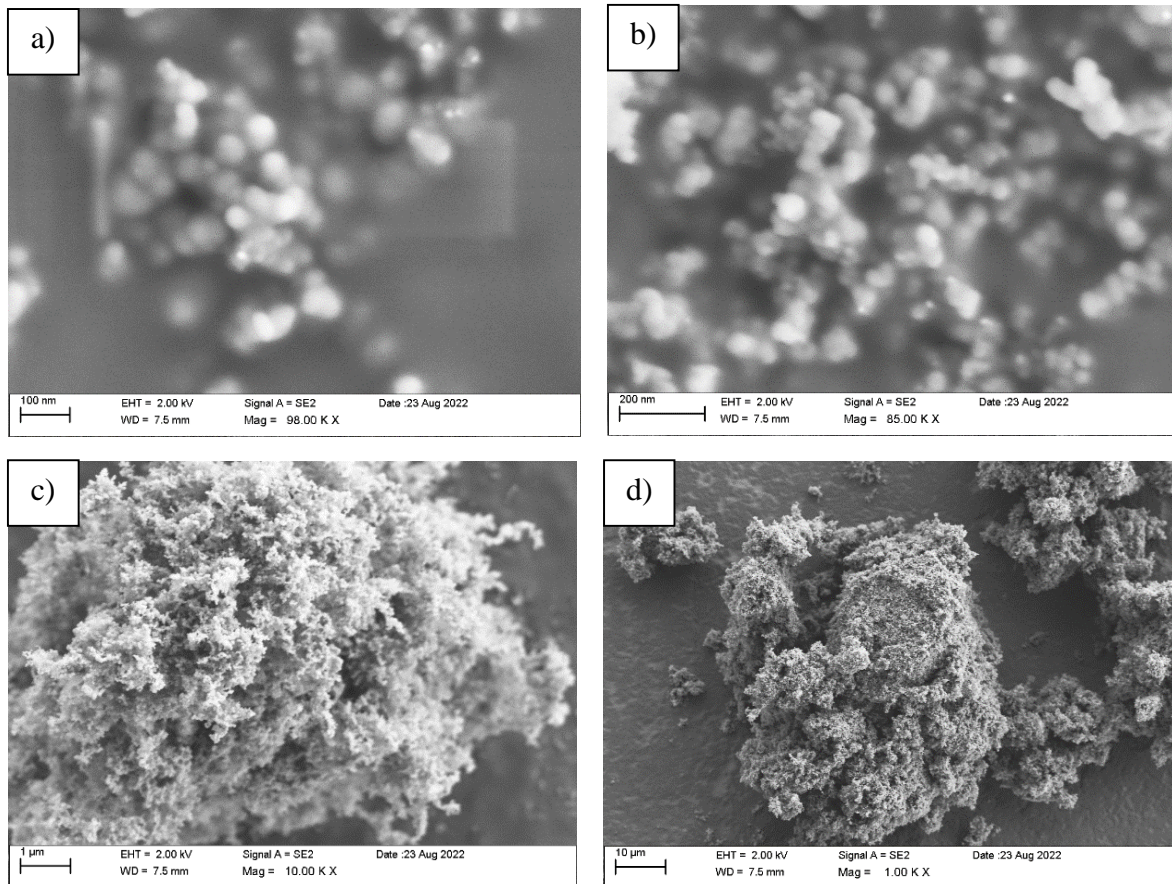


Figura 16. Microscopias SEM de las AuNP/carbón vulcan.

La microscopia electronica de barrido (SEM) nos permite caracterizar el tamaño, morfología y distribución de las nanoparticulas de oro soportadas en carbon vulcan (AuNP/carbon vulcan).

En la figura 16 se muestran las microscopias SEM con diferentes aumentos (a – d) donde es posible observar que a menor aumento (16a) se observan con claridad nanoparticulas metalicas brillantes bien definidas y separadas con agregación ocasional. La agregacion puede deberse a la porosidad del carbon vulcan que podria inducir una mayor concentracion en las zonas porosas del material. De esta manera podemos visualizar que hubo formacion de oro nanometrico disperso homogeneamente y este presenta una forma esferica.

Esto último se puede percibir con mayor claridad en la imagen con el aumento superior inmediato (16b); por la dispersión se sugiere que la densidad de AuNP es homogénea en ese tamaño de partícula. En 16c podemos apreciar cómo las AuNP se depositan en la superficie del carbono vulcan, sin que exista una diferencia visible entre el carbono vulcan y las AuNPs.

Esta primera observación nos permite suponer que la adhesión de las AuNPs en el carbono vulcan se llevó a cabo de forma exitosa. La morfología del AuNPs/carbono vulcan juega un rol significativo en el funcionamiento de la electrocatalisis del diseño del sensor en desarrollo. Se puede observar que todo el material se encuentra monodisperso en el carbono vulcan, es decir, que todas las nanopartículas presentan una distribución de tamaño de partícula relativamente estrecha.

En 16d observamos la formación de granulos de carbono vulcan. La forma del material de soporte nos permite observar la formación de granulos poco compactos con una estructura porosa, donde podemos percibir la distribución de las AuNPs de forma extendida sobre la superficie. La superficie porosa no solo aumentó la superficie de la zona reactiva del material, sino que también favoreció la incrustación de las nanopartículas de oro.

La distribución de tamaño se encuentra principalmente alrededor de 20 nm aproximadamente. Esto puede deberse a que el método de síntesis mediante reducción química nos permite obtener tamaño de partícula con un buen margen de control.

El carbono vulcan y las AuNPs tienen intrínsecamente una alta conductividad eléctrica y una gran área superficial. La dispersión de las AuNP/carbono vulcan sobre la superficie del electrodo promovió un aumento de la densidad de sitios activos.

11.1.3 Microscopia SEM para las LDH-AuNPs/carbón vulcan

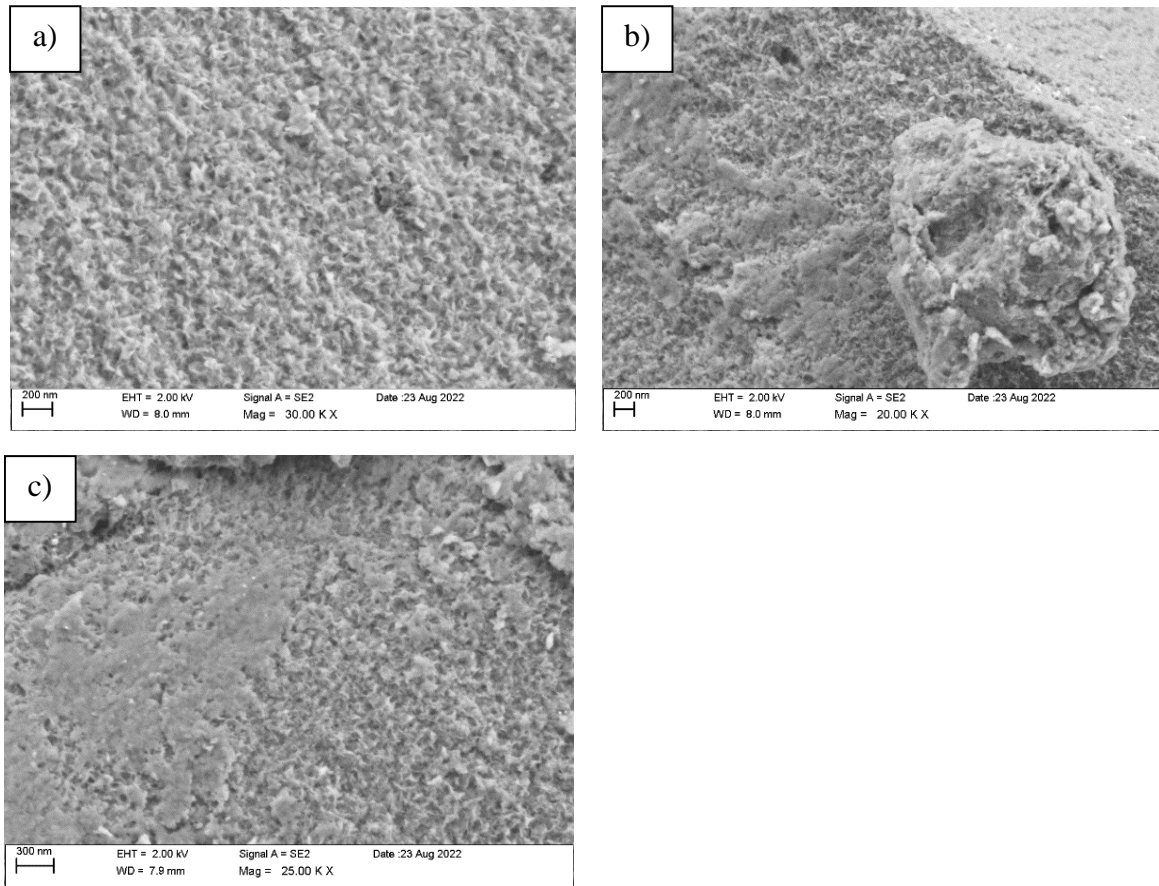


Figura 17. Microscopias SEM de las LDH-AuNP/carbón vulcan.

La morfología y distribución de las AuNPs depositadas sobre los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio (LDH-AuNPs), y, estos a su vez sobre el carbón vulcan (LDH-AuNPs/carbón vulcan) se nos muestran en la Figura 17. La estructura de los compósitos nos muestra que gran cantidad de nanoparticulas de oro fueron distribuidas en la superficie del material. Estas se observan como puntos brillantes extendidos por la superficie.

Al magnificar la imagen, como se observa en 17a y 17c se puede apreciar la distribución y la adhesión de las AuNPs sobre los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio. Esta correcta adhesión puede haber sido producida por absorción física durante el proceso de coprecipitación catalizado por los tratamientos de temperatura.

Mientras que en el caso de las AuNP/carbón vulcan se mostraban formas granulares debido al carbón vulcan como único material de soporte, en el caso de los LDH-AuNPs/carbón

vulcan, la figura 17a nos permite estudiar también la forma que presentan las láminas de estos últimos, los cuales presentan una textura escamosa y estratiforme, de forma que es ligeramente rugosa. También podemos señalar que la superficie de los hidróxidos doble laminares muestra una estructura con abundantes arrugas y ondulaciones. No se observa saturación de nanopartículas de oro sobre la superficie por lo que podemos deducir que las AuNPs se encuentran distribuidas de manera uniforme sobre las finas capas de los hidróxidos doble laminares. En 17b podemos observar la formación de un granulo, lo que podemos interpretar como la formación granular que nos mostraba el comportamiento del carbón vulcan como soporte.

Estas superficies no presentan pliegues, sino una morfología de lámina corrugada que no muestra una separación entre los hidróxidos doble laminares con las nanopartículas de oro, sino al contrario, nos permite suponer que la adhesión se llevó a cabo de manera exitosa con una fuerte interacción entre ambos materiales.

El proceso de formación del material compuesto fue inerrático y no aleatorio. Esto puede estar relacionado con la estructura superficial de las capas de los hidróxidos doble laminares, la cual, presenta una estructura tipo brucita, del tipo de arcillas anicónicas, las capas se forman compartiendo los bordes de las unidades octaédricas adyacentes, creando laminas bidimensionales que se apilan para formar estructuras tridimensionales mediante enlaces de hidrógeno (Silva, et al., 2013).

Los hidróxidos doble laminares y las AuNPs tienen intrínsecamente una alta conductividad eléctrica y una gran área superficial, así como la estructura de laminadas conectadas que puede servir como canal de conducción electrónica rápida para la detección en el electrodo.

La distribución de las nanopartículas sobre los sitios activos de los hidróxidos doble laminares nos permite suponer que es posible que se pueda favorecer la incrustación de electrones sobre la superficie. Es de esperar que la elevada área superficial, así como la conductividad y las propiedades catalíticas mejoren el rendimiento electroquímico del sensor, así como su sensibilidad al aumentar la distribución de los sitios activos del material.

11.1.4 Microscopia XRF para las LDH-AuNPs/carbón vulcan

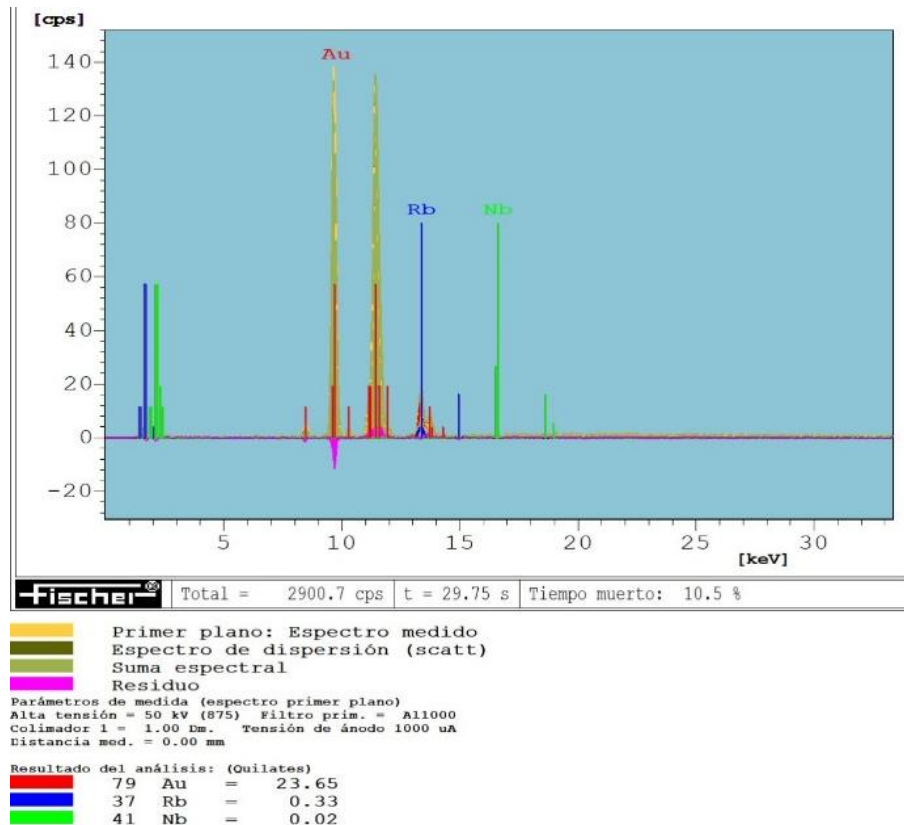


Figura 18. Análisis XRF de la muestra de LDH-AuNPs donde es posible apreciar las señales correspondientes a las nanopartículas de oro.

De forma adicional para confirmar la presencia del oro nanométrico (AuNPs) el material compuesto por hidróxidos doble laminares de Mg-Al soportados en carbón vulcan fueron caracterizados por espectroscopia XRF (espectroscopia de fluorescencia de rayos X), donde en el eje de las ordenadas se muestra la intensidad de conteos, es decir la cantidad de fotones secundarios recibidos por el detector al analizar el material, mientras que en el eje de las abscisas se nos muestra la energía de la longitud de onda en la que el material emitió los fotones característicos (expresados en keV).

La radiación de longitud de onda obtenida con mayor intensidad nos permite confirmar la presencia de oro, el cual se nos muestra como el elemento con la presencia mayoritaria (50.32%). Como es de esperarse, el oro aparece a 10 keV aproximadamente (Parreira, et. al., 2009) y aparece con una intensidad de alrededor de 140 conteos.

11.1.5 Análisis Raman para las LDH-AuNPs/carbón vulcan

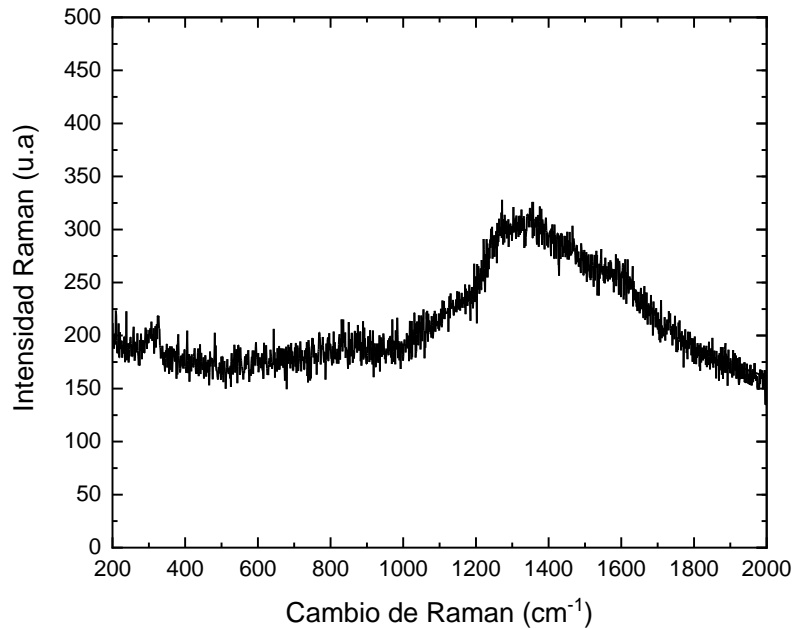


Figura 19. Espectro Raman del LDH-AuNPs/carbón vulcan.

Una vez que se llevó a cabo el estudio morfológico de las LDH-AuNP/carbon vulcan, la caracterización para confirmar la presencia de las nanopartículas de oro fue llevada a cabo mediante espectroscopia Raman, la cual se ilustra en la figura 19.

El espectro raman para el material compuesto LDH-AuNP/carbon vulcan muestra una banda ancha con una intensidad máxima de alrededor de los 1350 cm^{-1} que comienza a crecer alrededor de los 1150 cm^{-1} y comienza a decrecer alrededor de los 1650 cm^{-1} . Este comportamiento de bandas poco definidas se muestra de forma usual en materiales recubiertos con otro material metálico, siendo el rango del cambio de raman el rango característico para materiales recubiertos con oro nanométrico (Vaka, 2017), esto debido a que la presencia de nanopartículas de oro muestra picos característicos en la región desde 1300 hasta 1600 cm^{-1} (Jedrzejczak-Silicka, et al., 2020). Se puede observar que el ancho de la banda coincide con el ancho de banda para un material compuesto por lo que podemos suponer que la deposición del oro sobre el material de soporte se llevó a cabo exitosamente.

11.2 Caracterizaciones electroquímicas de las AuNPs/carbón vulcan-Nafion

11.2.1 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNP/carbón vulcan - Nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5

Las soluciones de vainillina se hicieron en buffer de fosfatos 0.1 M en agua desionizada (CAS 7732-18-5) donde se comprobó que la vainillina era muy soluble. El pH del buffer se utilizó a pH 6.5. Para ajustarlo se utilizaron soluciones de NaOH 1.0M y HCl 1.0M. Las soluciones de vainillina de diferentes concentraciones fueron preparadas con vainillina grado químico (99%, ChemCenter) partiendo de una solución de vainillina 5.0 mM. Para la preparación de las soluciones derivadas de la solución con concentración de vainillina 5.0 mM se empleó la siguiente formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

C_1 = concentración inicial

V_1 = volumen inicial

C_2 = concentración final

V_2 = volumen final

De forma que, al despejar el volumen inicial, que en este caso representa el volumen que necesitamos tomar de la solución original para preparar la solución deseada, obtenemos:

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde la C_2 es la concentración a la que queremos llegar, el V_2 es el volumen del matraz donde haremos la solución deseada y la C_1 es la concentración de la solución original (5mM). Para estas pruebas el V_1 fue tomado con micropipeta para asegurar una buena precisión. Cada una de las concentraciones se muestran en las gráficas. La concentración más baja probada fue de 0.1mM, y a partir de ella, se hicieron pruebas en soluciones con un incremento de 0.1mM hasta llegar a 1.0 mM, posterior a ello, el volumen fue incrementando 0.4mM, hasta alcanzar concentraciones superiores a 3.3 mM.

El rango que se buscó cubrir fue de 0.6mM a 3.3mM, ya que en este rango de concentración se encuentra la vainillina en los productos comerciales. Los resultados obtenidos para las primeras evaluaciones en buffer de fosfatos pH 6.5 se ilustra en la figura 20.

El área de deposición de la tinta sobre el electrodo de carbón vítreo se mantuvo constante durante todas las pruebas (el área superficial del electrodo se consideró igual a 1). Se realizaron 5 ciclos por cada prueba de voltamperometría cíclica en cada solución y se usó el ciclo 3 como ciclo de referencia. Para calcular la desviación estándar y las barras de error se comparó con el ciclo 2 y 4. Se usaron estos ciclos porque se observó eran los que tenían mayor estabilidad. El primer ciclo no se consideró al dar una curva incompleta, de la misma forma que el ciclo 5.

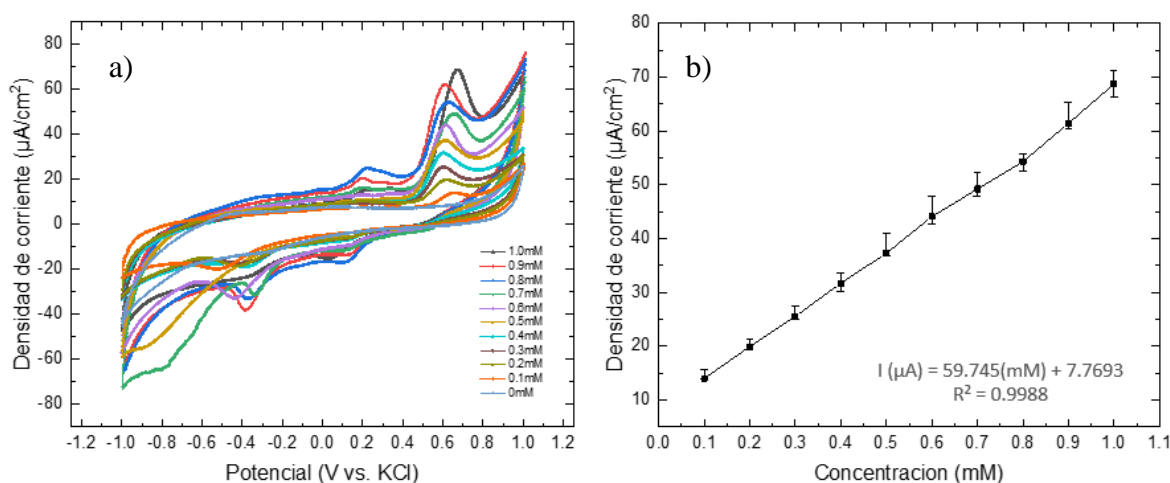


Figura 20. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 1.0mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

En la figura 20a se muestran las respuestas electroquímicas medidas a 20 mV/s en una ventana de potencial entre -1.0 y 1.0 V vs KCl. En esta primera grafica las concentraciones que fueron evaluadas fueron las concentraciones menores, es decir, las correspondientes a las soluciones de vainillina que van de 0 a 1 mM, incrementando 0.1mM. Dado que en este trabajo se utilizó un sensor electroquímico fabricado con una tinta polimérica, todas las mediciones electroquímicas se realizaron en un medio de pH controlado.

Tener la respuesta electroquímica de una solución de vainillina de 0 mM nos permite establecer un control y conocer cómo se comporta el electrodo en ausencia de vainillina. En

este caso se puede denotar que en ausencia de vainillina no se obtiene ningún pico de oxidación utilizando el electrodo de carbón vítreo recubierto con la tinta de AuNP/carbón vulcan- Nafion.

Los picos asociados al proceso de oxidación de la vainillina se registraron tanto en barridos hacia adelante como hacia atrás. El potencial de inicio de la electrooxidación partió de 0.2V y se observa que la variación en el rango de potencial en donde apareció el pico es altamente estrecha.

En estos voltamperogramas se obtuvieron señales bien definidas alrededor de 0.6mM que de acuerdo al estado del arte corresponde a la señal de corriente característica de la vainillina en un pH de 6.5 (Cheraghi, et al., 2017). Este hecho está relacionado con la transferencia de un electrón (de acuerdo al modelo propuesto por Cheraghi, et. al., 2017) por enlace roto para la formación de la vainillina oxidada. Los picos adicionales que presentan las curvas de los voltamperogramas cíclicos fuera del rango de voltaje característico para la vainillina se atribuye a oxidaciones de otras moléculas contaminantes presentes en la solución de vainillina. Se observó que tanto la corriente de fondo como el ruido también aumentaron al aumentar la concentración de vainillina en las soluciones.

Todas las mediciones se realizaron en celdas cerradas con 10 mL de las soluciones de vainillina en buffer de fosfatos con diferente concentración. Durante el proceso se observó que, si el pH o la dispersión de la tinta cambian, estas señales pueden desplazarse en el espectro de potencial afectando a su identificación. En este sentido, es importante conocer previamente el pH y mantenerlo constante durante todas las mediciones.

Tras llevar a cabo cada análisis electroquímico de las concentraciones presentadas en 20a una curva de calibración lineal ($R^2 = 0.9988$) para la vainillina se obtuvo por CV en un rango de concentración de 0.1 a 1mM, con una pendiente de $59.745 \mu\text{A mM}^{-1}$ y una intercepción de $7.7693 \mu\text{A}$ (como se muestra en 20b). Se calculó una desviación estándar relativa de 4.93% para el rango de concentración de vainillina 0.1 a 1.0 mM para las pruebas del sensor con la película de AuNP/carbón vulcan-Nafion en soluciones buffer de fosfatos pH 6.5.

a)

b)

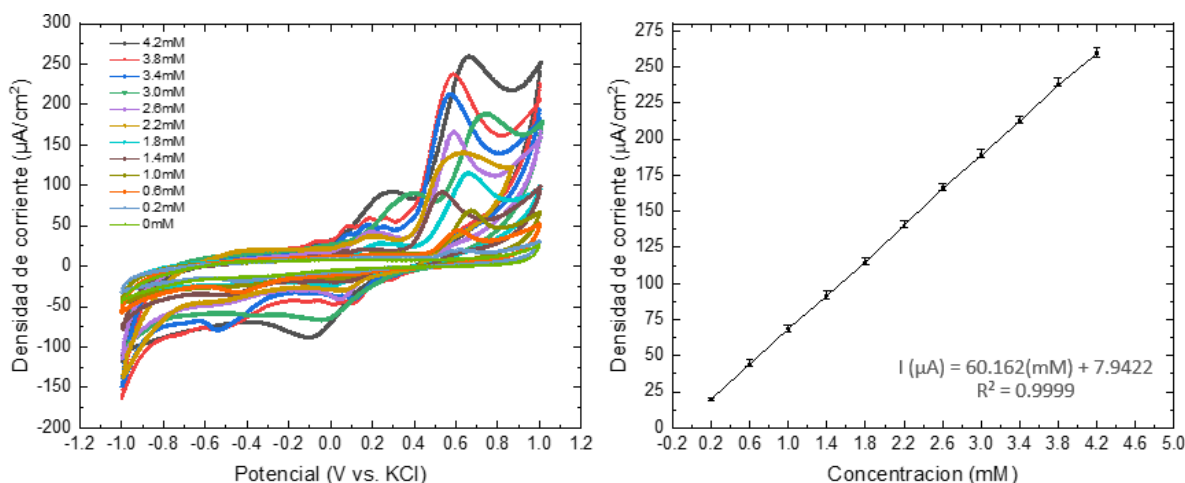


Figura 21. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 4.2mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

En la figura 21a, se tiene los voltamperogramas para concentraciones de vainillina de 0.2mM a 4.2 mM, con un intervalo de concentración de 0.4 mM

Las señales de corriente características de igual manera como se mostró en la figura 21, se realizaron en la misma ventana de potencial de -1.0 a 1.0 V vs KCl, con una tasa de exploración de 20 mV/s. Se incluye en esta grafica una curva correspondiente al control (solución en buffer de fosfatos pH 6.5 con una concentración de vainillina de 0 mM) donde se puede reconocer que en ausencia de vainillina no se presenta ninguna señal o respuesta a una reacción de oxidación o reducción.

Se muestra que el pico de oxidación característico de la vainillina a diferentes concentraciones se ubica alrededor de 0.6mV, sin embargo, en este caso se percibe una mayor variación en el potencial donde apareció el pico de oxidación para cada caso.

Esto puede deberse a que, al efectuarse varias pruebas sobre las mismas soluciones, la cantidad de iones de hidrogeno libres en la solución aumentó progresivamente, de forma que las soluciones se volvieron más acidas al llevarse a cabo varias pruebas sobre una misma solución. Al reducir el valor de pH (incrementando los iones de hidrogeno libres) el potencial en el que se presentó el pico de oxidación aumentó (Cagri, et. al., 2018), por lo que vemos algunos picos de oxidación con mayor corrimiento hacia valores altos de potencial.

En la figura 21b se elaboró una curva de calibración con los valores de corriente obtenidos con cada pico de oxidación de vainillina correspondientes a una concentración específica. Con esta información fue posible definir la ecuación característica ($I(\mu A) = 60.162 \cdot C(mM) + 7.9422 \mu A$) para el rango de concentraciones evaluados, en la cual, hubo una ligera variación con los datos obtenidos en el rango de concentraciones menores, sin embargo tanto el valor de pendiente como el de intercepción se mantienen bastante cercanos a los obtenidos en el primer gráfico de concentraciones menores. El gráfico de calibración lineal obtenido presenta un valor de $R^2=0.9999$ y una desviación estándar relativa de 2.54%. Se determinó un límite de detección de 0.03637 mM de acuerdo al criterio $3S_b/m$, donde m , es la pendiente de la función que describe la curva de calibración y S_b es la desviación estándar (0.7293).

Mediante este último valor es posible evaluar la confiabilidad y la reproducibilidad de la curva de calibración obtenida en relación a la linealidad que esta curva presenta. Esta ecuación puede estandarizarse para la elaboración y diseño físico del sensor para su aplicación industrial.

11.2.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5

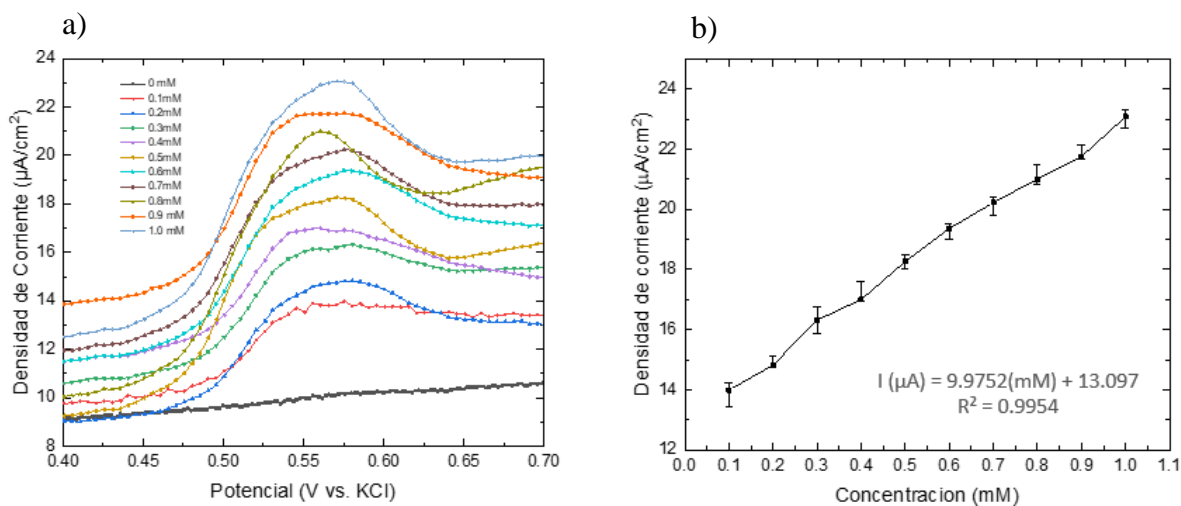


Figura 22. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 1.0 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

El rendimiento electroanalítico también fue probado empleando técnicas de voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Es importante mencionar que para este tipo de pruebas no se realizaron optimizaciones de los parámetros para mejorar la sensibilidad. La ventana de potencial en la que se llevó a cabo el escaneo fue desde 0 a 0.7 V vs KCl, con un tamaño de escalón de 5 mV, un tamaño de pulso de 20 mV, un periodo 0.2 s y un tiempo de pulso de 0.05 s. En todas las pruebas de voltamperometría de pulso diferencial el área del electrodo se consideró igual a 1.

La gráfica presente en la figura 22a nos muestra el comportamiento electroquímico de la oxidación de vainillina partiendo de una solución de 0.1 hasta 1.0 mM, con un aumento de concentración de 0.1 mM. En esta gráfica se incluye la respuesta electroquímica obtenida para un control de vainillina 0 mM en el mismo buffer de fosfatos pH 6.5. Se observa que no hay evidencia de algún pico de oxidación correspondiente a alguna otra sustancia presente en la solución de vainillina, por lo cual los picos de oxidación de vainillina podemos atribuirlos a la presencia de vainillina.

Estas señales correspondientes a los picos de corriente de oxidación de la vainillina se encuentran alrededor de 0.6 V con un ligero corrimiento hacia 0.55 V. La separación de densidad de corriente al aumentar la concentración de vainillina en 0.1 mM es de alrededor 1 μA , donde la primera señal, correspondiente a la concentración de 0.1 mM se encuentra cerca de 14 μA . Los picos se encuentran bien definidos pero se percibe que en las concentraciones más bajas estos se suavizan. Esto puede deberse a que se encuentra muy cerca del límite de detección del sensor y que en esas concentraciones el ruido involucrado en la detección es más significativo.

Para evaluar la linealidad de la ecuación de diseño y lo cercana que esta se encuentra a la regresión realizada con los datos obtenidos se calculó un factor de correlación R^2 donde obtuvimos $R^2=9.9954$, como se muestra en 22b. Para la ecuación de diseño del sensor en este rango de concentraciones menores se obtuvo una pendiente de 9.9752 $\mu\text{A mM}^{-1}$ y una intercepción de 13.097 μA .

Al realizar el cálculo de la desviación estándar relativa se obtuvo un valor de 1.733%. Para calcular la desviación estándar se llevaron pruebas por triplicado para cada concentración de vainillina evaluada en solución de buffer de fosfatos pH 6.5. Las barras de

error nos indican que la mayor variabilidad se encuentra en las señales obtenidas en las concentraciones menores, sin embargo, al comenzar a aumentar la concentración las barras de error se vuelven menos significativas.

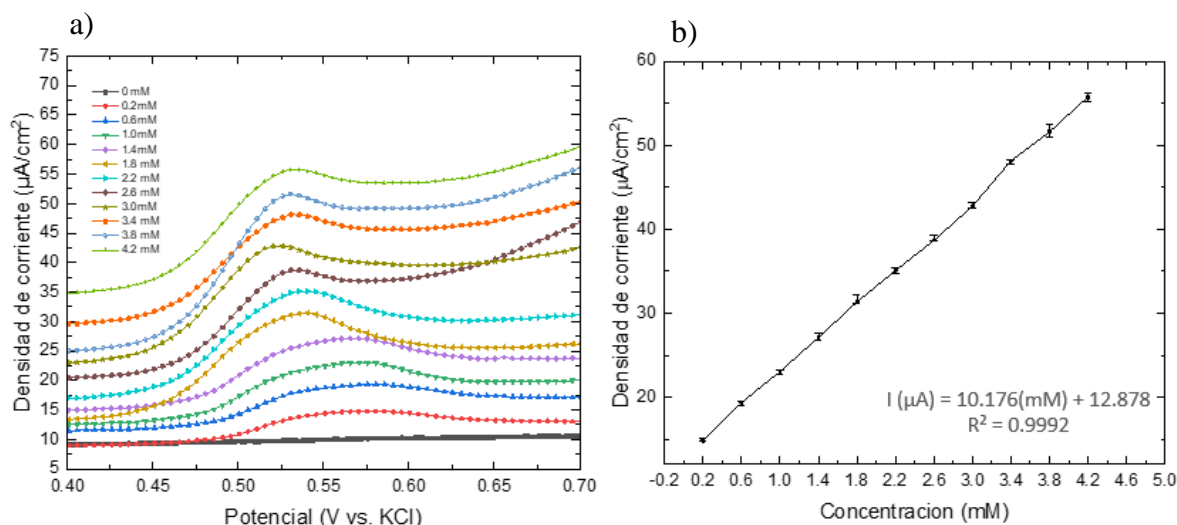


Figura 23. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 4.2 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Para evaluar el comportamiento electroquímico de la vainillina en concentraciones mayores, se hicieron evaluaciones con el electrodo de AuNPs/carbón vulcan-Nafion en soluciones de vainillina partiendo de 0.2 mM hasta 4.2 mM, con un incremento entre ellas de 0.4 mM.

La figura 23a muestra la aplicación del potencial sobre el electrodo de trabajo para la determinación de densidad de corriente obtenida en cada una de las concentraciones evaluadas de vainillina en las soluciones en buffer de fosfatos pH 6.5. Se incluye el control representado por la primera curva que nos muestra el comportamiento electroquímico para una solución de vainillina 0 mM; con ello podemos apreciar que incluso a concentraciones mayores no tenemos presencia de algún otro material que pudiese estar siendo oxidado o reducido, por lo que las señales obtenidas podemos atribuir las a la detección de vainillina.

Los picos de oxidación se muestran más definidos que a concentraciones menores, sin embargo, aún se logra apreciar que el ruido presente hace que las curvas se muestren más suaves. Las señales se vuelven más definidas al aumentar la concentración; esto podemos

atribuirlo a que la densidad de corriente obtenida por la oxidación de vainillina se vuelve mayor en relación al ruido generado durante el barrido de potencial.

Los picos de oxidación aparecen alrededor de 0.55V con una variación en el rango de potencial sumamente estrecha. El coeficiente de correlación mejora a concentraciones mayores siendo de $R^2=0.9992$. Se puede observar que las barras de error tienen un rango de variación más estrecho en este rango de concentraciones, lo que podría significar que a concentraciones mayores las variaciones se vuelven menos significativas. El sensor muestra un buen grado de precisión en la determinación de vainillina dentro del rango de concentraciones presentes en los productos lácteos comerciales objetivo (0.6 a 3.3 mM).

El valor de pendiente obtenido es de $10.176 \mu\text{A mM}^{-1}$ mientras que el valor de intercepción es de $12.878 \mu\text{A}$. La desviación estándar relativa es de 1.148% para el rango de concentraciones mayores de vainillina partiendo de 0.2 a 4.2 mM. Se determinó un límite de detección de 0.0377 mM de acuerdo al criterio $3S_b/m$, donde m , es la pendiente de la función que describe la curva de calibración y S_b es la desviación estándar (0.1279).

11.2.3 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan - Nafion en leche entera

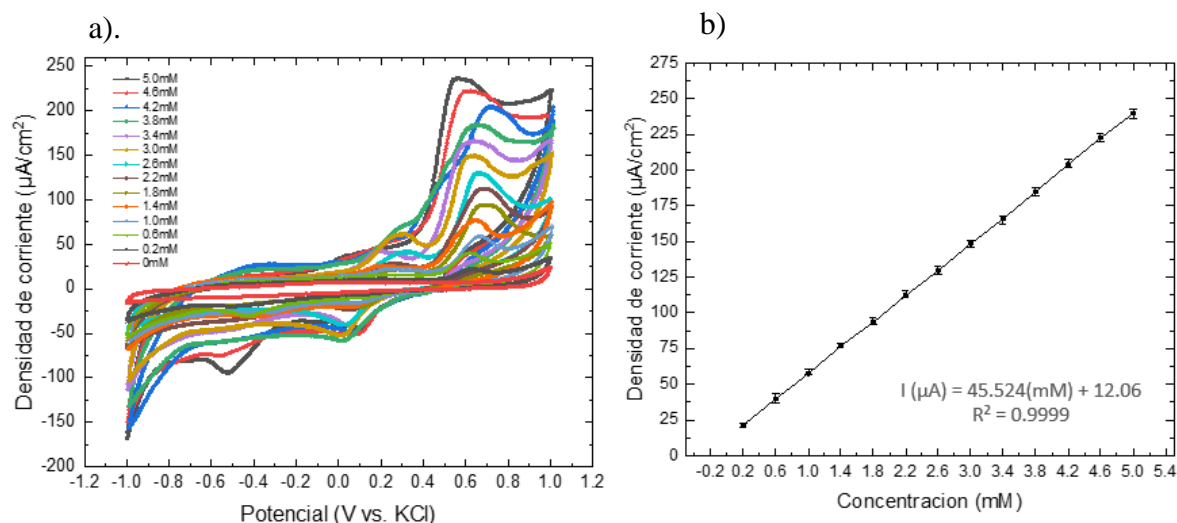


Figura 24. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 5.0 mM en leche entera Araceli usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Tras realizarse las voltamperometrias ciclicas y de pulso diferencial en soluciones de vainillina en buffer pH 6.5 con el sensor de carbon vitreo recubierto con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, se llevaron a cabo las mismas pruebas en soluciones de vainillina en leche comercial (para estas pruebas se uso leche de la marca Araceli). De la misma forma que en las soluciones de buffer, para obtener cada una de las soluciones se partio de una solucion de vanillina 5mM en leche, y, a partir, de ella se tomaron alicuotas con micropipeta para preparar las soluciones de menor concentracion.

En la figura 24a se presentan los picos de oxidacion obtenidos para un rango de concentracion de 0 a 5.0 mM, utilizando la misma velocidad de exploracion (*scan rate*) que en el caso de las pruebas realizadas en buffer de fosfatos pH 6.5 (20 mV/s). El control nos muestra que el electrodo se mantiene estable en ausencia de vainillina por lo que las contribuciones en las señales que podrían presentarse por componentes de la leche no se consideran significativas.

Los barridos se hicieron en una ventana de potencial de -1.0 a 1.0 V, hacia adelante y hacia atrás, para observar el comportamiento electroquimico de la vainillina al llevarse a cabo la oxidacion y la reduccion. Los barridos no coincidieron hacia adelante y hacia atrás, como podriamos esperar en un sistema reversibe por lo que podemos suponer que se trata de una reaccion irreversible.

Por otro lado, en la figura 24a se muestra que los picos obtenidos por la oxidacion de la vainillina en soluciones de leche se muestran menos definidos que los obtenidos en soluciones buffer de fosfatos pH 6.5, lo cual podemos suponer que guarda relacion con los posibles interferentes y los componentes presentes en la leche que generan ruido a lo largo del barrido de potencial. Sin embargo, los picos se mantienen bien definidos por lo que es posible inferir que el electrodo recubierto con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion mantiene una buena conductividad en las soluciones en leche con todas las concentraciones de vainillina.

La densidad de corriente obtenida para el pico de oxidacion de la concentracion mas baja evaluada (solucion en leche de vainillina 0.2mM) fue de 21.46 μA , mientras que para la concentracion mas alta (solucion en leche de vainillina 5.0 mM) el pico de oxidacion alcanzó 239.5 μA , se mantuvo una consistencia en el potencial en el que aparecieron los picos de oxidacion para las concentraciones dentro de este rango manteniendose alrededor de los 0.6

V, lo que nos permite observar que el pH de la leche no provoca cambios significativos en la aparición del pico de oxidación característico de la vainillina.

En la figura 24b se ilustra la ecuación correspondiente a la regresión lineal generada por las señales obtenidas. Las barras de error nos muestran que la variación entre los resultados obtenidos es muy estrecha, por lo que podemos inferir que existe un buen grado de reproducibilidad.

La curva de calibración lineal ($R^2 = 0.9999$) nos muestra la relación correspondiente entre la corriente obtenida (expresada en μA) y la concentración de la solución (expresada en mM), de forma que se obtiene un valor de pendiente de $45.524 \mu\text{A mM}^{-1}$ y una intersección de 12.06. La desviación estándar calculada para este rango de concentraciones fue de 2.7885%, mientras que la desviación estándar tuvo un valor de 2.5413. Utilizando el criterio $3S_b/m$, se obtuvo un límite de detección de 0.16747 mM.

El límite de detección se continúa encontrando por debajo de la concentración mínima de vainillina de productos lácteos comerciales (0.6mM) por lo que esta curva de calibración puede ser útil para la construcción de un sensor de vainilla en productos lácteos a escala industrial.

11.2.4 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion en leche entera

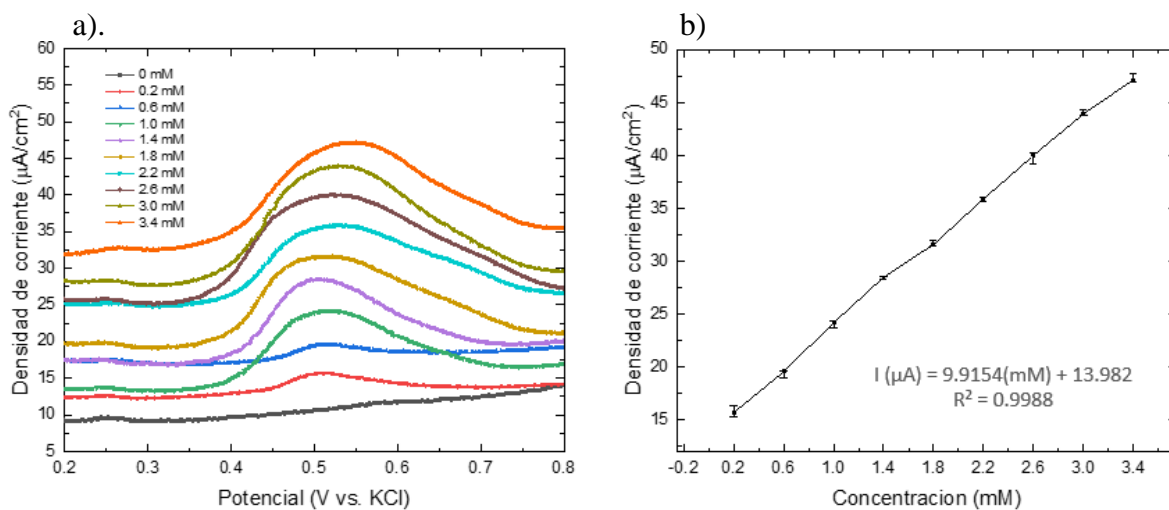


Figura 25. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.4 mM en leche entera Araceli usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Al obtener la información de que el pico de oxidación característico para la vainillina se presenta alrededor de 0.55V al llevar a cabo voltamperometría de pulso diferencial, la ventana de potencial en la que se realizó el escaneo partió de 0.2 hasta 0.8 V, donde se evaluó la corriente obtenida para cada una de las concentraciones de vainillina en soluciones de leche entera (marca Araceli) partiendo de una concentración de 0.2mM hasta 3.4mM, con una separación de concentración de 0.4mM. Este rango de concentraciones propuestos para las evaluaciones de oxidación de vainillina se eligió con el propósito de abarcar las concentraciones presentes en helados comerciales (0.6 a 3.3 mM) de la misma forma que en las pruebas de voltamperometría cíclica.

Por otra parte, de la misma forma que en las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) realizadas para las soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5, las pruebas se realizaron con un tamaño de escalon de 5 mV, un tamaño de pulso de 20 mV, un periodo 0.2 s y un tiempo de pulso de 0.05 s. En todas las pruebas realizadas el área del electrodo se considero igual a 1.

En la gráfica expuesta en 25a es posible percibir que se incluye el control donde podemos notar que tiene señales muy débiles en 0.25V y alrededor de 0.58 V. Estas señales podemos atribuir las a la presencia de componentes inherentes de la leche que se oxidan durante el barrido del potencial, con una contribución poco significativa; a medida que la concentración de vainillina aumenta, estos picos se vuelven apenas perceptibles. Los picos de oxidación obtenidos para las concentraciones de 0.2 y 0.6 mM se muestran anchos y suavizados, sin embargo a partir de 1.0 mM se muestran más definidos.

En comparativa, los picos de oxidación obtenidos en buffer de fosfatos pH 6.5 para todo el rango de concentraciones de vainillina, estos se perciben más suavizados, mientras que los picos obtenidos en las pruebas realizadas en leche se perciben más definidos. Este comportamiento puede deberse a las contribuciones de otros componentes de la leche que ayudan a tener una densidad de corriente más significativa. Esto puede verse también con el grosor de los picos, ya que para las señales obtenidas en soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5 los picos son más estrechos, mientras que en los voltamperogramas realizados

en soluciones de vainillina en leche los picos de oxidacion son mas gruesos. Esto nos da un indicio de que las señales obtenidas pueden ser el resultado de una contribucion de señales.

El primer pico de oxidacion correspondiente a una concentracion de 0.2 mM exhibe una densidad de corriente de 15.68 μA , mientras que para la concentracion mayor (correspondiente a una concentracion de 3.4 mM) la densidad de corriente alcanzada por el pico de oxidacion es de 47.14. La diferencia de corriente entre un pico y otro es de 4 μA . Este comportamiento resulta muy similar al comportamiento observado en los voltamperogramas de pulso diferencial llevados a cabo en soluciones en buffer (figura 19a).

En la figura 25b se ilustra la curva de calibracion lineal ($R^2 = 0.9988$) obtenida para la vainillina en el rango de concentraciones de 0 a 3.4mM mediante voltamperometria de pulso diferencial (DPV). La ecuacion que describe la regresion lineal obtenida con los datos reales se ilustra en la la figura 25b donde se obtiene una pendiente de 0.9154 $\mu\text{A mM}^{-1}$ con una intercepción de 13.982 μA . Se calculó una desviacion estandar relativa de 1.2991%, lo cual nos muestra que la variacion en los picos obtenidos es estrecha. Esta inferencia se confirma con el comportamiento de las barras de error mostradas en 25b donde podemos apreciar que los resultados de las pruebas por triplicado para cada una de las concentraciones son muy similares. Las mayores variaciones se observan en las concentraciones de 0.2 mM y 2.6mM, mientras que en el resto no se observa una variacion importante.

En cuanto al limite de deteccion, se obtuvo un valor de 0.1048 mM, esto nos permite confirmar que mediante la tecnica de voltamperometria de pulso diferencial en muestras de leche aun es posible cuantificar concentraciones menores a las encontradas en productos comerciales, donde el valor minimo de concentración es de 0.6 mM. Este calculo se llevo a cabo utilizando el criterio $3S_b/m$ en el cual se considero una desviacion estandar de 0.34626.

11.2.5 Voltamperometrías cíclicas (CV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan - Nafion en helado

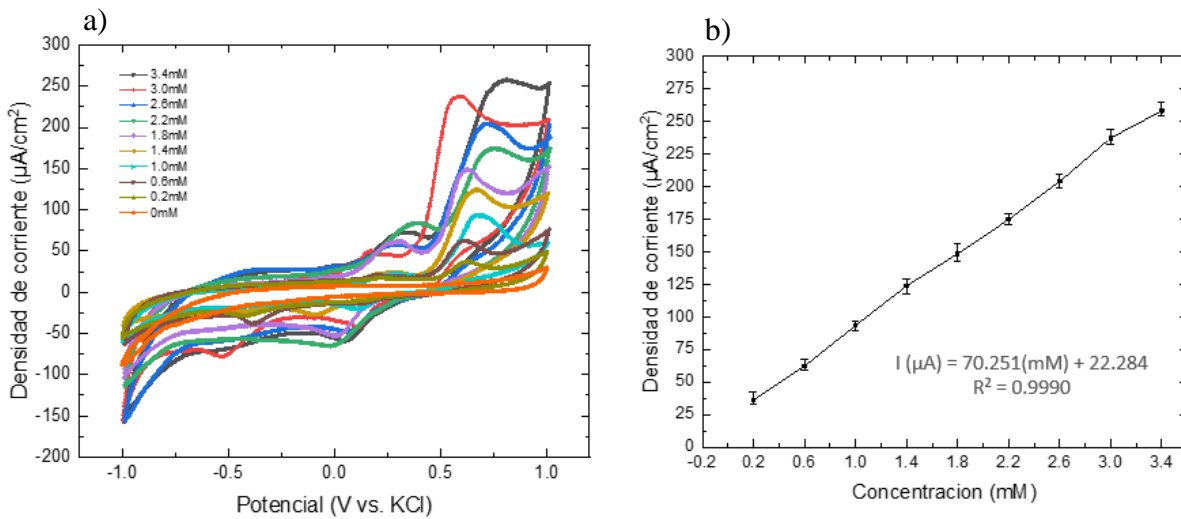


Figura 26. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.4 mM en helado elaborado en el laboratorio con concentraciones de vainillina conocidas usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Finalmente se realizaron evaluaciones en muestras de helado con concentraciones de vainillina conocidas preparadas en el laboratorio. El helado en el laboratorio se preparó utilizando azúcar común, leche entera (marca Araceli), crema para batir (marca Lyncott) en la proporción: 0.5:1:3. Para incorporar la vainillina se utilizó vainillina grado químico (99%, ChemCenter). Todos los ingredientes se mezclaron perfectamente aplicando un mezclador en frío por aproximadamente 90 minutos. Este proceso permitió incorporar el aire y lograr la textura de un helado firme.

De la misma forma que en las pruebas anteriores, se partió de una solución de vainillina 5 mM preparada en el helado de crema, y a partir de ella se tomaron alícuotas para realizar las soluciones de concentraciones menores, utilizando un helado sin sabor para formar cada una de las muestras.

Las pruebas se realizaron dentro de una celda cerrada con 10 mL de helado. De la misma forma que en las voltamperometrías cíclicas realizadas para soluciones en buffer de fosfatos pH 6.5 y leche, la ventana de barrido de potencial fue de -1.0 a 1.0 V, la tasa de exploración fue de 20 mV/s y se realizaron ciclos hacia adelante y hacia atrás. Las gráficas obtenidas en

la figura 26a nos muestran la relación entre la concentración de vainillina y el pico de corriente obtenida para cada una de ellas al efectuarse la oxidación. Las pruebas se realizaron en concentraciones a partir de 0 mM hasta 3.4 mM.

En la figura 26a es posible observar que el control (muestra de helado en ausencia de vainillina) no muestra la aparición de ninguna señal, el ruido de fondo no es tan significativo, por lo que podemos descartar la aparición de algún pico o señal procedente de algún otro compuesto presente en los ingredientes empleados para la elaboración del helado. La aparición de los picos de oxidación característicos de la vainillina se percibe en un barrido de potencial entre 0.6 y 0.7 V.

Estas señales se muestran menos estrechas que las obtenidas en soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5 o las obtenidas en soluciones de leche. Este efecto puede estar relacionado a la integración de aire presente en el helado que podría estar generando resistencia en la conductividad sobre la superficie del electrodo recubierto con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, por lo que los picos de oxidación se ven más anchos y suavizados, especialmente el correspondiente a la concentración mayor, el cual es de vainillina 3.4 mM. En ella podemos percibir que el pico es mucho más ancho que en las concentraciones menores.

Este hecho podemos relacionarlo con la posibilidad de que, a concentraciones mayores, y en presencia del aire integrado en el helado, la conductividad de la superficie del electrodo se vea perturbada. A concentraciones mayores es posible que los sitios de detección del electrodo se vean saturados, mientras que la presencia del aire puede generar resistencia y aumentar el ruido de fondo. En contraste, los picos de concentraciones más bajas al mostrar picos bien definidos en cada uno de los voltamperogramas, nos permiten suponer que presentan una buena sensibilidad a la detección de vainillina dentro de los productos objetivo en el rango de concentraciones comerciales.

Al observar el comportamiento, tanto del barrido de potencial hacia adelante como hacia atrás, los barridos no coincidieron en ninguno de los casos, por lo que podemos suponer, que al igual que en los voltamperogramas anteriores, se trata de una reacción de oxidación irreversible.

La figura 26b nos muestra la gráfica correspondiente a la curva de calibración obtenida con los datos reales de la densidad de corriente para cada una de las concentraciones de vainillina. En ella se aprecia que se obtuvo un factor de correlación $R^2 = 0.9990$. Esto nos demuestra que el aumento de densidad de corriente es altamente lineal en relación con el aumento de concentración de vainillina.

Por otro lado, se realizó la comparación entre tres curvas de cada una de las concentraciones evaluadas para obtener las barras de error. Como se observa en 26b se puede percibir que la distancia es estrecha entre cada grupo de datos, con una distancia de densidad de corriente más significativa que las obtenidas en gráficas en el mismo rango de concentraciones en soluciones de buffer de fosfatos pH 6.5 y soluciones de leche, sin embargo, el factor de correlación nos indica que presenta un buen nivel de reproducibilidad.

La ecuación de diseño se ilustra de la misma forma en 26b, para la cual tenemos una pendiente de $70.251 \mu\text{A mM}^{-1}$ y un valor de intercepción de $22.284 \mu\text{A}$. La desviación estándar relativa calculada para la vainillina en este rango de concentración es de 4.692% y el límite de detección es de 0.21608 mM usando el criterio $3S_b/m$, donde m , es la pendiente de la función que describe la curva de calibración y S_b es la desviación estándar (5.0599). A pesar de que el límite de detección aumento, este valor se sigue encontrando por debajo de la concentración mínima de vainillina encontrada en productos lácteos comerciales (0.6 mM). Es posible sugerir que el comportamiento del sensor de AuNP/carbón vulcan-Nafion es adecuado para usarse como un material para la determinación de vainillina en helados dentro del rango de concentración de vainillina en productos lácteos comerciales (de 0.6 a 3.3 mM).

11.2.6 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion en helado

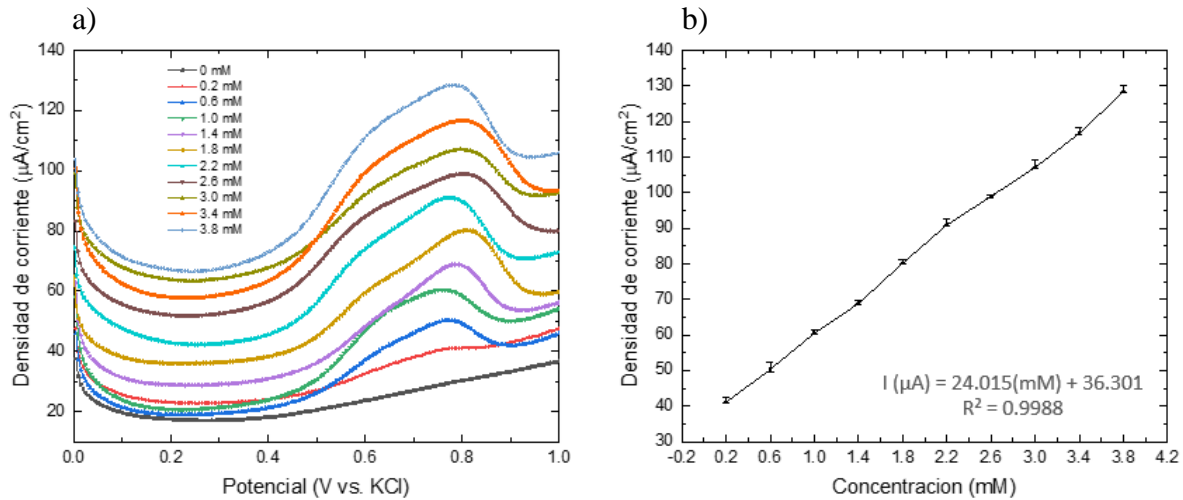


Figura 27. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.8 mM en helado elaborado en el laboratorio con concentraciones de vainillina conocidas usando la tinta de AuNPs/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Se realizaron voltamperometrías de pulso diferencial para evaluar el comportamiento electroquímico de la vainillina en muestras de helado realizadas en el laboratorio con concentración conocida. Se emplearon las mismas muestras de helado realizadas para las voltamperometrías cíclicas (CV) por lo que la composición de las muestras de helado es la misma que las mostradas en la figura 27. Las concentraciones empleadas comenzaron con un control, es decir una muestra de helado sin vainillina, posteriormente se probó una muestra de helado de vainillina 0.2 mM y a partir de ella se incrementó la concentración de vainillina 0.4 mM. La concentración máxima probada fue 3.8 mM.

La ventana de barrido de potencial fue de 0 a 1.0 V, se utilizaron las mismas condiciones de exploración: un tamaño de escalón de 5 mV, un tamaño de pulso de 20 mV, un periodo de muestra de 0.2 y un tiempo de pulso de 0.05 segundos. Se consideró un área de electrodo igual a 1 en todas las pruebas. Al igual que en todos los voltamperogramas realizados en todas las pruebas anteriores, se usó un electrodo de referencia con una solución saturada de KCl.

En la figura 27a se puede apreciar que los picos de oxidación se encuentran desplazados a la izquierda apareciendo alrededor de los 0.8V, sin embargo el crecimiento del pico comienza desde alrededor de 0.5V. El control nos muestra que hay un crecimiento lineal en ausencia de vainillina, lo que podemos atribuirlo a ruido de fondo, ya que no hay alguna señal sobresaliente a lo largo del barrido del potencial.

La primera señal correspondiente a una muestra de helado con una concentración de vainillina 0.2 mM es apenas perceptible, cuyo valor de densidad de corriente fue de 41.14 μA . La forma de los picos de oxidación se mantuvo muy similar para todas las concentraciones donde todos los puntos máximos se presentan con una variación altamente reducida en el eje del potencial. La densidad de corriente obtenida para la concentración más alta de vainillina 3.8 mM fue de 128.46 μA . El aumento de densidad de corriente entre un pico de oxidación y otro fue de alrededor de 10 μA .

En la figura 27b se ilustra la curva de calibración obtenida con los resultados globales de las pruebas realizadas en 27a. La ecuación obtenida que describe la curva de calibración se realizó mediante regresión lineal, para la cual el factor de correlación nos muestra una linealidad de $R^2 = 0.9988$. Este dato nos permite conocer que el comportamiento de las señales reales obtenidas en los picos de oxidación se ajustan muy bien a la ecuación lineal.

La reproducibilidad se evaluó realizando cada uno de los voltamperogramas por triplicado para cada concentración. La variación entre las densidades de corriente obtenidas para cada concentración se ilustra mediante las barras de error. Se puede apreciar que la variación es estrecha y solo resaltan dos concentraciones (0.6 y 3.0 mM) con mayor variabilidad, aunque no llega a ser altamente significativa, por lo que, podemos sugerir que el sistema de sensor nos provee de un método con buena reproducibilidad.

La ecuación de diseño elaborada con regresión lineal mediante los datos obtenidos muestra la relación entre la densidad de corriente (expresada en μA) esperada para una concentración específica de vainillina (expresada en mM), de forma que $I(\mu\text{A}) = 24.015 \cdot C(\text{mM}) + 36.301$. La desviación estándar relativa calculada para este rango de concentraciones es de 1.1972%, y el límite de detección calculado es de 0.1114 mM, bajo el criterio $3S_b/m$, donde m es la pendiente de la gráfica de calibración y S_b es la desviación estándar, que para este rango de concentraciones se considera como $S_b = 0.89207$. En comparación con los resultados

obtenidos mediante voltamperometria ciclica, la voltamperometria de pulso diferencial nos permite alcanzar un limite de deteccion menor y presenta una desviacion estandar mas reducida por lo que podemos suponer que mediante este metodo podemos alcanzar un mayor grado de deteccion y una mejor reproducibilidad.

11.3 Caracterizaciones electroquímicas de las LDH-AuNPs/carbón vulcan

11.3.1 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5

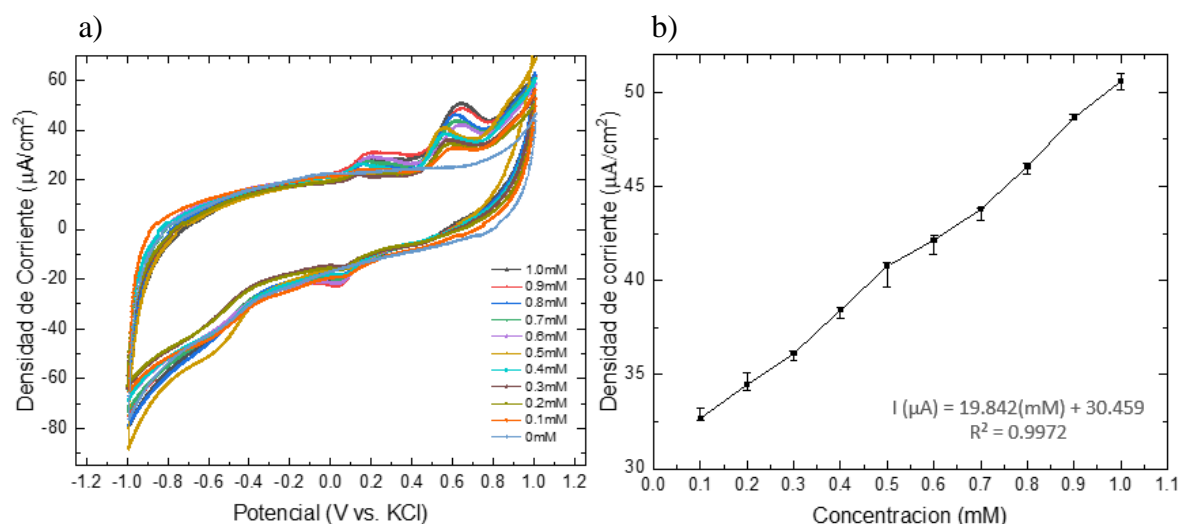


Figura 28. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 1.0 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

De manera inicial, el comportamiento electroquímico se comprobó mediante voltamperometrias ciclicas (CV) en soluciones buffer de fosfatos pH 6.5 con concentraciones de vainillina de 0 a 1.0 mM, con un aumento de concentracion de 0.1 mM, con el proposito de conocer el comportamiento del electrodo de carbon vitreo recubierto con la tinta preparada con nanoparticulas de oro soportadas en los hidroxidos doble laminares de Magnesio y Aluminio (LDH-AuNP), y a su vez dispersadas en carbon vulcan y nafion (LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion) para la formacion de la pelicula sobre el electrodo.

Se llevaron a cabo barridos de potencial hacia adelante y hacia atrás desde -1.0 hasta 1.0 V para observar los picos de oxidación y ver si existía algún pico de reducción. Es importante mencionar que para todas las pruebas realizadas no se realizaron optimizaciones de los parámetros para mejorar la sensibilidad. La velocidad de exploración fue de 20 mV/s y por cada concentración se llevaron a cabo 5 ciclos. Para observar la estabilidad de la detección mediante el sistema compuesto de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion se compararon las señales de densidad de corriente obtenidas entre los ciclos 2, 3 y 4. Los ciclos mostrados en 28a corresponden a los ciclos 3 de cada uno de los experimentos.

De la misma forma que en los experimentos realizados al hacer la evaluación con AuNPs como material de sensado, las soluciones de vainillina se realizaron partiendo de la solución de mayor concentración, y las de menor concentración se realizaron mediante la toma de alícuotas, utilizando la Ec. 2 para conocer el volumen requerido para cada una de las concentraciones.

La primera voltamperometría se realizó en una solución control, es decir, en buffer de fosfatos pH 6.5 en ausencia de vainillina utilizando LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion como material de detección. Se observa una curva más ancha sin presencia de alguna señal, por lo que podemos suponer que el sensor no detecta algún otro compuesto en el buffer. Desde la concentración más baja (vainillina 0.1 mM) se observa la aparición de picos de oxidación bien definidos en un rango de 0.55 a 0.8 V, lo cual se encuentra dentro de lo esperado (Cheraghi, et al., 2017). En comparación con los obtenidos con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, los picos son menos estrechos, lo que puede estar relacionado con el ancho de las curvas generadas.

Se observa además la aparición de pequeños picos suavizados alrededor de los 0.2V, lo que nos permite suponer que el material está reaccionando a otra especie o compuesto encontrado en la vainillina, que podría ser alguna traza de algún tipo de contaminación o bien, algún subproducto presente al momento de realizar la oxidación de la vainillina. Sin embargo, estas pequeñas señales no parecen ser constructivas con la detección de la vainillina por lo que no representan mayor problema al momento de cuantificar la densidad de corriente obtenida en cada pico de oxidación.

El primer pico de oxidacion aparece con una densidad de corriente de 32.69 μA . Esta densidad de corriente es mayor que la obtenida en la misma concentracion (vainillina 0.1 mM) con el sensor AuNP/carbon vulcan-nafion, la cual fue de 14.04 μA . El aumento de densidad de corriente entre una concentracion y otra fue de alrededor de 2 μA (mientras que con el sensor de AuNP/carbon vulcan-nafion fue de alrededor de 6 μA). El mayor ensanchamiento de la curvas a concentraciones bajas y el bajo aumento de densidad de corriente entre un pico de oxidacion y otro nos permite suponer que es posible que el ruido de fondo resulte significativo en este rango de concentraciones, esto puede ser debido a que la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion sea mas receptiva a otras contribuciones y que al tener un sistema de varias capas de hidroxidos doble laminares se genere una resistencia entre ellas al momento de llevar a cabo la oxidacion.

En 28b se ilustra la curva de calibracion lineal obtenida mediante las densidades de corriente registradas para el rango de concentraciones de vainillina de 0 a 1.0 mM. El valor del factor de correlacion fue de $R^2 = 0.9972$, mientras que la ecuacion que describe la curva de calibracion tuvo una pendiente de $19.842 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$ y un valor de interseccion de 30.459 μA .

En 28b tambien se ilustra la variacion entre la densidad de corriente obtenida en los picos de oxidacion en las curvas 2 y 4 mediante las barras de error. Podemos observar que la variacion es ligeramente menor que las obtenidas con el sensor de AuNP/carbon vulcan-nafion. La mayor variacion se encuentra en las concentraciones de 0.5 y 0.6 mM, sin embargo no encontramos solapamientos entre densidades de corriente, por lo que podemos suponer que la estabilidad y especificidad es adecuada para el desarrollo de un sensor y para detectar cambios de concentracion relativamente bajos. Tomando estos datos como referencia se calculo la desviacion estandar relativa, cuyo valor fue de 0.8709%. La desviacion estandar fue de 0.35105.

Posteriormente, se evaluaron concentraciones mayores de vainillina en buffer de fostatos pH 6.5. Se partio de 0 mM (es decir, de una prueba en buffer en ausencia de vainillina para obtener el control) hasta una concentracion de 5.0 mM. Los voltamperogramas obtenidos se ilustran en la Figura 29.

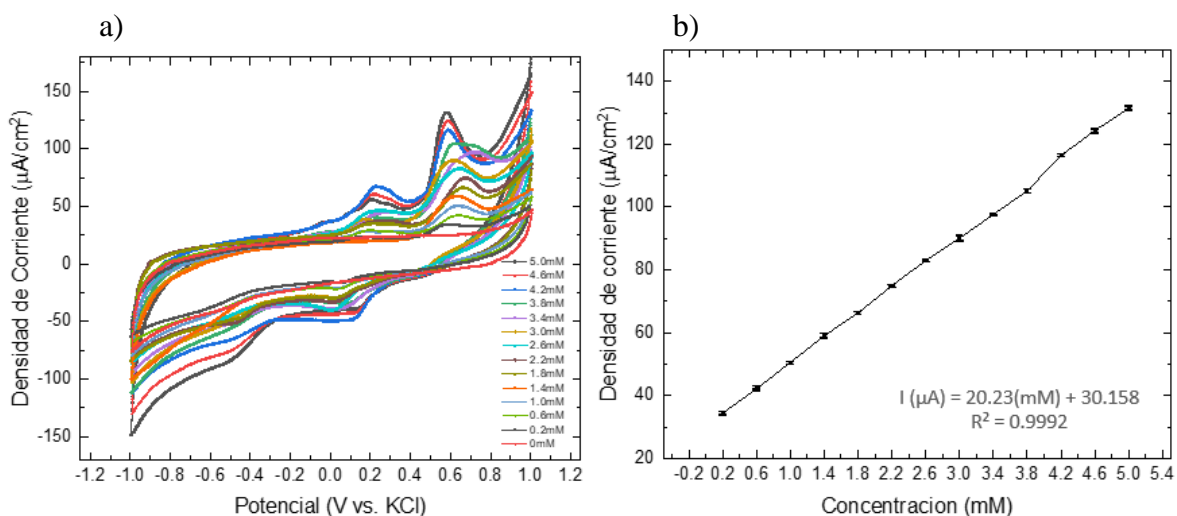


Figura 29. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 5.0 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Se usaron las mismas condiciones que se usaron en las evaluaciones de concentraciones menores: un barrido de potencial de -1.0 hasta 1.0 V, una velocidad de exploración de 20 mV/s, el potencial de inicio de la electro oxidación partió de 0.2V, se considero un area superficial del electrodo igual a 1 y el potencial se comparo contra un electrodo de referencia de KCl. El aumento de concentracion entre cada solucion fue de 0.4mM.

En 29a se observa que a mayores concentraciones la mayoría de los picos de oxidacion se muestran mas definidos, de forma muy similar que los picos obtenidos con el sensor recubierto con AuNP/carbon vulcan-nafion, por lo que podemos inferir que ambos presentan una conductividad parecida; la menor concentracion (vainillina 0.2 mM) presenta una densidad de corriente de 34.47 µA mientras que la mayor concentracion (vainillina 5.0 mM) presenta una densidad de corriente de 131.46 µA. El aumento de densidad de corriente entre un pico de oxidacion y otro es de aproximadamente 8 µA.

De la misma forma que en concentraciones menores, se observa la aparicion de señales alrededor de 0.25V, que aumentaron al aumentar la concentracion de vainillina sin que estas presenten contribucion con los picos de oxidacion caracteristicos de la vainillina. Estas señales aparecen suavizadas con un ancho de pico considerable, por lo que podemos suponer la posibilidad de que sea la contribucion resultante de varias señales de intensidades menores.

De forma adicional, podemos observar en 29a que hay una menor tasa de variabilidad en el barrido de potencial, donde se puede apreciar que los picos de oxidación aparecen en un rango altamente estrecho. Se observa un mejor control en cuanto al potencial en el que aparecieron los picos de oxidación en relación con los obtenidos en los voltamperogramas usando AuNP/carbon vulcan-nafion en concentraciones similares.

Por la forma de los picos de oxidación en relación con las señales obtenidas en el proceso de reducción podemos deducir que la reacción es irreversible, ya que en el barrido de potencial de 1.0 a -1.0 V la curva no regresa por el mismo camino del sentido opuesto. El ancho de las curvas sigue siendo de un tamaño similar al encontrado en los ciclos de concentraciones menores (puede notarse por la relación con la curva correspondiente al control, es decir, la curva realizada en el buffer en ausencia de vainillina) por lo que el ruido de fondo sigue considerándose relativamente alto, aunque ya no tan considerable en relación con la densidad de corriente de los picos de oxidación.

La curva de calibración obtenida para este rango de concentraciones se ilustra en 29b, donde podemos apreciar que los datos reales obtenidos mediante las pruebas de voltamperometría cíclica (CV) se ajustan muy bien a la ecuación de diseño. El factor de correlación $R^2=0.9992$ nos permite visualizar que tiene un alto índice de linealidad por lo que resulta una propuesta que podría ser confiable para el desarrollo de un sensor de vainillina en soluciones buffer a un pH 6.5. La pendiente de la curva descrita es de $20.23 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y la intercepción de $30.158 \mu\text{A}$.

Se calculó una desviación estándar relativa de 0.7035% y una desviación estándar de 0.5026. Con este último valor fue posible calcular el límite de detección, mediante el criterio $3S_b/m$, donde m , es la pendiente de la función que describe la curva de calibración y S_b es la desviación estándar. El valor resultante del límite de detección fue 0.06375 mM. Esto nos indica que el sensor de carbón vítreo recubierto con LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion es altamente sensible y que tiene la capacidad de detectar concentraciones de vainillina en el rango de las concentraciones de vainillina usadas en productos comerciales, siempre y cuando se realicen en muestras con un alto grado de solubilidad como se muestra en el caso del buffer de fosfatos.

Por otro lado, el comportamiento electroquímico de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion se comprobó mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV) en soluciones de vainillina en buffer de fosfatos. Inicialmente se realizaron pruebas con concentraciones de vainillina de 0 a 1.0 mM, con un aumento de concentración de 0.1 mM. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 30.

11.3.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5

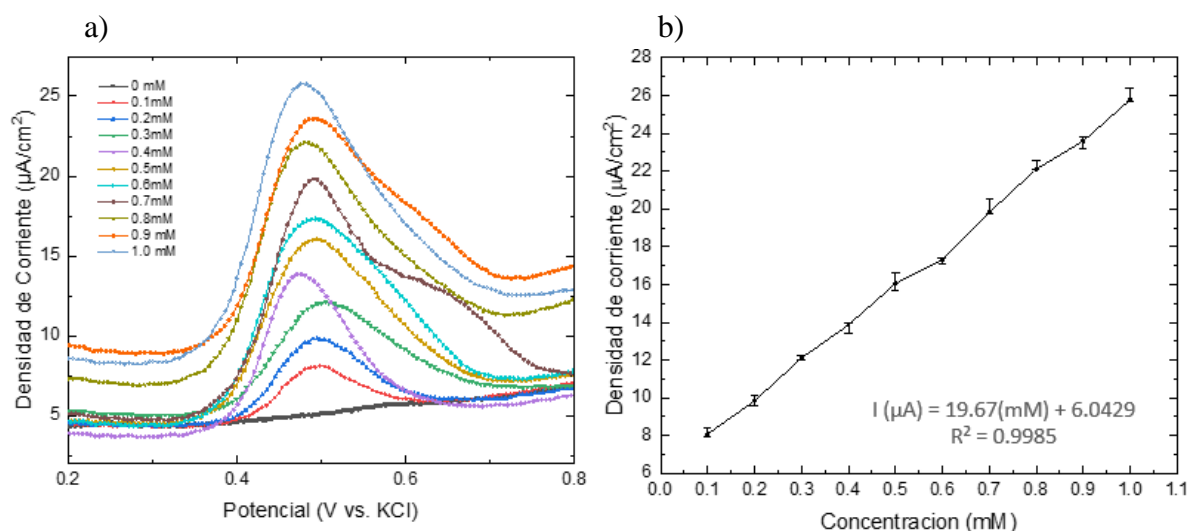


Figura 30. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 1.0 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

La vainillina fue oxidada en una ventana de exploración fue de 0.2 a 0.8V, ya que la señal esperada de la vainillina se muestra alrededor de los 0.6V. De la misma forma que en las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) realizadas con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, se mantuvieron las mismas condiciones para todas las voltamperometrías de pulso diferencial consiguientes. Se consideró un tamaño de escalon de 5 mV, un tamaño de pulso de 20 mV, un periodo e muestra de 0.2 y un tiempo de pulso de 0.05 segundos. Es importante mencionar que para todas las voltamperometrías de pulso diferencial probadas con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion no se realizaron optimizaciones para mejorar la sensibilidad.

Se considera el area del electrodo de trabajo igual a 1 y como electrodo de referencia se una un electrodo de KCl. Todas las voltamperometrias se realizaron en celdas cerradas con 10mL de cada solucion, respectivamente.

El pico de oxidacion se encuentra desplazado ligeramente hacia la izquierda apareciendo alrededor de los 0.5V, esto puede deberse a varios factores, como la distribucion de la tinta, el tiempo de secado, los cambios de la temperatura ambiente o alguna posible variacion en el pH del buffer empleado. Por otro lado una posible hipotesis de este comportamiento podria ser debido a que al haber obtenido los picos de oxidacion con un menor potencial con LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion, este ultimo material podria presentar una mayor actividad electroquimica en comparacion con el electrodo recubierto con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, de forma que podria tener una mejor interaccion con la vainillina.

Para comprobar que se trata del pico de oxidacion caracteristico de la vainillina se evalua primero el control, realizando una voltamperometria de pulso diferencial en el buffer de fosfatos pH 6.5 en ausencia de vainillina para conocer el comportamiento del electrodo y de la tienda por mi mismos de manera sinergica.

El control nos muestra un ligero aumento de potencial a lo largo del barrido de potencial, sin llegar a ser significativo, ya que a lo largo del barrido de potencial, la densidad de corriente se mantuvo alrededor de los 5 μ A. Se observa una pequeña señal obtenida alrededor de los 0.6V, por lo que podemos inferir la posibilidad de que esta contribucion sea inherente a la vainillina y sea proveniente de algun otro compuesto presente en el buffer de fosfatos pH 6.5.

Los picos de oxidacion se muestran significativamente mas definidos en comparativa con las voltamperometrias de pulso diferencial realizadas con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion en el mismo rango de conentraciones. Las señales aparecen en un rango altamente estrecho en el barrido de potencial y en solo dos de las concentraciones (0.7 y 0.9 mM) se observa la contribucion de la deteccion mostrada en el control en ausencia de vainillina presente alrededor de los 0.6V, por lo que podemos suponer que de ser un compuesto contaminante, este no esta presente en todas las muestras evaluadas, por lo que puede ser resultado de la manipulacion de las muestras que lo presentan.

Para la concentración más baja, es decir la solución de vainillina 0.1 mM se tiene una densidad de corriente de 8.094 μA , al aumentar la concentración, la distancia de densidad de corriente entre un pico de oxidación y otro es de alrededor de 2 μA . La densidad de corriente para la concentración más alta correspondiente a la solución de vainillina 1.0 mM fue de 25.78 μA . En comparación con las voltamogramas obtenidas en el mismo rango de concentraciones con el electrodo de AuNP/carbon vulcan-nafion, las señales obtenidas con el sensor de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion tiene una ventana de densidad de corriente más amplia, ya que en la concentración menor percibe una menor densidad de corriente y para la concentración mayor este último alcanza una densidad de corriente superior.

En 30b se ilustra la ecuación correspondiente a la curva de calibración, cuyo valor de pendiente es de 19.67 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con una intersección de 6.0429 μA y un valor de $R^2=0.9985$. Este último nos indica que se alcanza un nivel de linealidad muy estrecho en relación con la regresión lineal expresada por la ecuación de diseño. En relación con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, se puede apreciar una mejora en cuanto a la linealidad en el rango de concentraciones de vainillina de 0 a 1.0 mM.

Para evaluar su reproducibilidad se hicieron pruebas por triplicado, cuyos resultados se expresan mediante las barras de error ilustradas en 30b. De forma similar que con el factor de linealidad, el margen de error también se ve reducido al usar la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion como material de detección. Con esta información se obtuvo una desviación estándar relativa de 1.8992% y una desviación estándar de 0.2957. Estas mejoras podrían deberse a que al integrar las AuNPs en un material de soporte podemos tener una dispersión más uniforme, lo que mejora la cantidad de sitios activos y también la conductividad del material. Esto corrobora que podría ser un soporte que mejoraría las propiedades de las nanopartículas y su estabilidad como método de detección.

Posteriormente, se evaluó el comportamiento de la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion en un rango de concentraciones mayores partiendo de soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5 de 0.2mM hasta alcanzar una concentración de vainillina 3.4 mM, con un incremento de concentración de 0.4mM. Los voltamogramas obtenidos se ilustran en la figura 31.

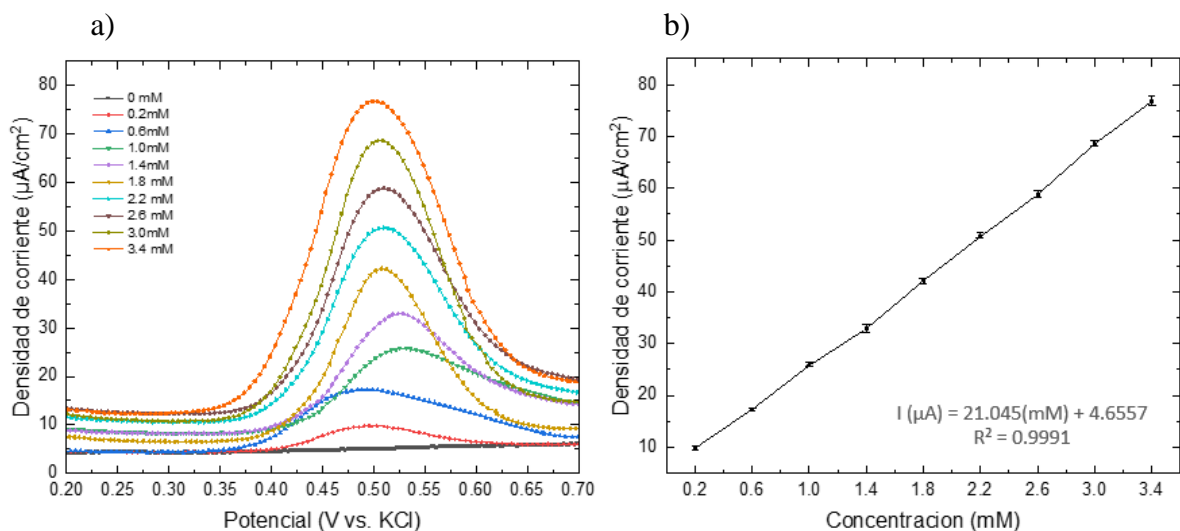


Figura 31. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.4 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5 usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

En la figura 31a se muestra la relación entre la concentración de vainillina y el pico de corriente obtenido en cada una de las concentraciones al efectuarse la oxidación. Los picos de oxidación aparecen alrededor de 0.52V, de forma que se encuentran ligeramente desplazados a la izquierda de acuerdo a lo esperado (alrededor de 0.6V) de manera similar que en los voltamperogramas de concentraciones menores. Los picos aparecen de forma muy ajustada, siendo la serie de voltamperogramas con la más controlada distribución en cuanto al potencial de aparición de los picos de oxidación.

En control no nos muestra alguna señal que presente una contribución importante, por lo que podemos descartar la aparición de alguna señal constructiva a las señales obtenidas de la oxidación de la vainillina. Los picos de concentraciones bajas (los correspondientes a las concentraciones igual o menores a 1.0mM) muestran señales bien definidas, pero con picos de oxidación anchos en comparación de los picos de oxidación obtenidos a partir de la solución de vainillina 1.4 mM hasta 3.4 mM. Estos últimos presentan una picos definidos y angostos lo que nos muestra una buena especificidad y un bajo ruido de fondo durante las pruebas. Este comportamiento se podría ver favorecido por la integración de los hidróxidos doble laminares de Magnesio y Aluminio como sistema de soporte, ya que, al ser un material conductor y estable, le provee de una estructura definida y estable a las AuNPs, mejorando su capacidad de detección y eliminando el ruido que podría generarse por alguna acumulación de densidad de corriente en alguno de los sitios activos. La linealidad de las

señales obtenidas se muestra en 31b, donde se observa que los datos reales se ajustan muy bien a la curva generada por regresión lineal. La ecuación de diseño nos muestra la correspondencia entre la corriente esperada para cualquier concentración en un rango de 0 a 3.4mM, para la cual se tiene una pendiente de $21.045 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ con una intercepción de $4.6557 \mu\text{A}$. El factor de correlación $R^2=0.9991$ nos indica que a concentraciones mayores la linealidad de los valores obtenidos mediante las voltamperometrias de pulso diferencial se vuelve mas estrecha y por lo tanto los valores obtenidos se muestran mas especificos.

Para evaluar la reproducibilidad se realizó cada una de las detecciones de vainillina en cada concentración por triplicado. Los resultados de cada una de las concentraciones se ilustra en 31b, donde se aprecia que la variación entre los resultados de cada concentración no se muestra significativa. Esto nos permite tener un mayor nivel de confiabilidad en el material como metodo de sensado ya que la informacion obtenida es altamente fiable con lo obtenido de manera matematica. La desviación estandar relativa calculada para este rango de concentraciones es de 1.46498% mientras que la desviación estandar es de 0.5441. Este ultimo dato nos permite calcular el limite de detección mediante el criterio $3S_b/m$ utilizado previamente, donde S_b es la desviación estandar. El limite de detección es de 0.0624 mM, cuyo valor es estrechamente similar con el limite de detección obtenido mediante voltamperometria ciclica (CV) para la vainillina en soluciones buffer.

Posteriormente, la estabilidad y sensibilidad del sensor electroquímico propuesto mediante el uso de la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion se evaluó haciendo pruebas en soluciones de vainillina en leche saborizada y helado, respectivamente. Se usó el mismo electrodo y el mismo sistema de deposición, se usó $2 \mu\text{L}$ de tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion, y de comparo contra el mismo electrodo de referencia de KCl. Es importante mencionar que cuando la tinta alcanzó un tiempo mayor a 24 horas almacenada, se realizó un baño sónico durante 20 minutos para asegurarse de que la tinta se encontrara homogéneamente dispersada antes de aplicarse en la superficie del electrodo.

11.3.3 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNPs en leche entera Araceli

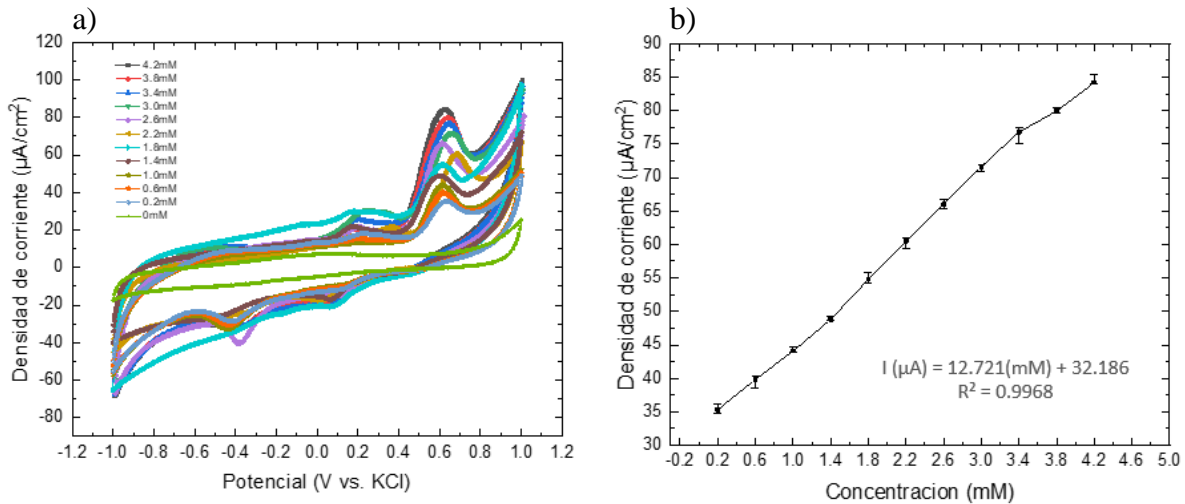


Figura 32. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 4.2 mM en leche entera Araceli usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Para estudiar el comportamiento electroquímico del electrodo de carbón vítreo recubierto con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en soluciones de leche saborizada, se realizaron soluciones de vainillina en leche entera (se usó marca Araceli). Para ello se realizó una solución de vainillina 4.2 mM en leche entera y a partir de ella se realizaron soluciones de concentraciones inferiores utilizando la Ec. 2 para conocer el volumen requerido para cada una de ellas. El rango de concentraciones de vainillina evaluado fue de 0 a 4.2 mM con una distancia de concentración de 0.4 mM. Se utilizó la misma ventana de barrido de potencial, de -1.0 a 1.0 V, y una velocidad de exploración de 20 mV/s. Se consideró un área superficial del electrodo igual a 1 y el potencial del electrodo de trabajo se comparó contra un electrodo de referencia de KCl.

En la figura 32a se muestran todos los voltamperogramas obtenidos para cada una de las concentraciones probadas, así como una curva de control que nos permite saber cómo se comporta la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en ausencia de vainillina. Podemos observar que la curva del control no se muestra especialmente ensanchada, pero sí presenta una formación de un pico ruidoso de baja densidad de corriente alrededor de los 0.1 V. Debido a que su aparición se presenta en ausencia de vainillina, las señales obtenidas en ese

potencial a lo largo del barrido no se considerarán como parte de las señales obtenidas por la oxidación de vainillina.

Para las soluciones de vainillina en leche entera podemos apreciar que los picos se encuentran bien definidos y aparecen en un rango de barrido de potencial sumamente alineado. Todos los picos se encuentran alrededor de los 0.6V, como es de esperarse de acuerdo a la literatura (Cheraghi, et. al., 2018). Las curvas presentan un mayor ensanchamiento, por lo que podemos asumir que al aumentar la concentración de vainillina también aumenta el ruido de fondo. Se observa un crecimiento en la señal detectada entre 0.1 y 0.2V presente en el control. Este comportamiento puede estar relacionado con sustancias presentes en la leche que podrían estar contribuyendo a la formación de picos de oxidación a lo largo del barrido del potencial, hacia adelante y hacia atrás, sin embargo, estos no aparecen solapados con los picos de oxidación correspondientes a la vainillina.

El pico de oxidación de menor concentración corresponde a la solución de vainillina 0.2 mM en leche, cuyo valor de densidad de corriente fue de 35.31 μA . La concentración más alta evaluada fue la solución de vainillina 4.2 mM en leche, para la cual se obtuvo una densidad de corriente de 84.18 μA . El aumento de densidad de corriente es de aproximadamente 5 μA entre una concentración y otra.

De forma similar a los resultados obtenidos para soluciones de vainillina en buffer, podemos notar que, al hacer voltamperometrías con el sensor de carbón vítreo recubierto con LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion, las densidades de corriente obtenidas en la primera concentración (vainillina 0.2mM) son mayores que las obtenidas con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, sin embargo la distancia de densidad de corriente entre una concentración a otra disminuye al usar la tinta que integra los hidróxidos doble laminares en su estructura, por lo que para las concentraciones mayores, las densidades de corriente obtenidas con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion se muestran mayores.

Este hecho podría ser resultado de la estructura doble laminar que conforma la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion. Una posible hipótesis es que podría resultar difícil para los electrones liberados durante la oxidación acceder a los sitios activos de detección internos entre las multicapas de los hidróxidos doble laminares, por lo que una vez que la concentración de la vainillina comienza a aumentar, comienza a existir una competencia por

los sitios activos superficiales, de forma que el llegar a sitios internos entre las capas podría generar una resistencia, y por lo tanto un menor aumento de detección. Sin embargo, se observa que se mantiene un buen comportamiento en cuanto a la linealidad de los picos obtenidos, como se muestra en 32b. El factor de correlación obtenido es $R^2 = 0.9968$. Esto nos indica que las densidades reales obtenidas para cada concentración se ajustan muy bien a la ecuación obtenida por regresión lineal, cuyo valor de pendiente es de $12.721 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y valor de intercepción es de $32.186 \mu\text{A}$.

La reproducibilidad del sistema se evalúa mediante la comparativa entre 3 curvas correspondientes a los voltamperogramas cíclicos para una cada una de las concentraciones. La variación de densidad de corriente nos indica que nivel de precisión podemos esperar al realizar los barridos de potencial para la detección de vainillina en leche. Se observa una variación levemente significativa, sin que haya un traslape de picos de oxidación por lo que podemos suponer que se trata de un sistema confiable. La desviación estándar relativa es de 1.2051% y el límite de detección alcanzado es de 0.1601 mM , considerando el criterio $3S_b/m$, donde m es la pendiente de la ecuación de diseño y S_b la desviación estándar, que para este caso $S_b=0.6789$.

En comparación con la desviación estándar relativa presentada en los voltamperogramas obtenidos mediante las pruebas realizadas con el sensor de AuNP/carbón vulcan-Nafion en el mismo rango de concentración en soluciones de vainillina en leche, se observa una mejora, teniendo una desviación estándar relativa menor en (en el caso de los voltamperogramas obtenidos con el sensor de AuNP/carbón vulcan-Nafion la desviación estándar relativa es de 2.7885%). Por lo que podemos observar que, en soluciones de vainillina en leche, la reproducibilidad mejora utilizando la tinta de LDH- AuNP/carbón vulcan-Nafion.

El límite de detección obtenido nos permite conocer que la tinta de LDH- AuNP/carbón vulcan-Nafion será capaz de abarcar el rango de concentración de vainillina encontrado en productos comerciales (de 0.6 a 3.3 mM) del mismo tipo.

11.3.2 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en leche entera Araceli

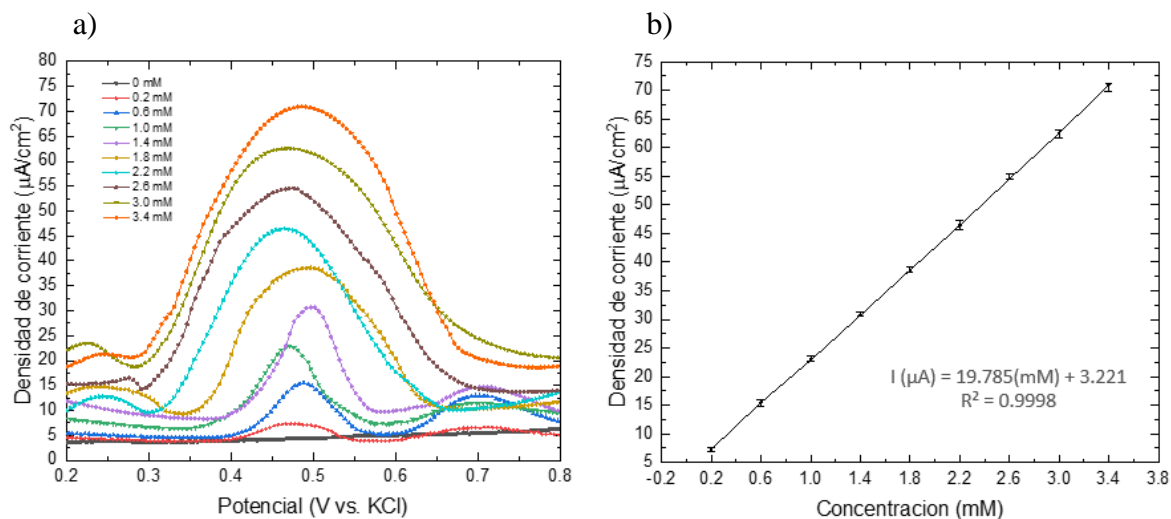


Figura 33. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.4 mM en leche entera Araceli usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Las soluciones de vainillina en leche fueron evaluadas por voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Las pruebas se realizaron en un rango de concentración de 0 a 3.4 mM, con un incremento de 0.4 mM entre cada concentración. Se utilizaron las mismas condiciones de exploración estandarizadas para las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) llevadas a cabo anteriormente. La ventana de barrido fue de 0.2 a 0.8V, ya que dentro de este rango se encuentra el pico de oxidación de la vainillina. Los voltamperogramas obtenidos bajo estas condiciones se ilustran en la figura 33a.

De forma similar a los voltamperogramas obtenidos con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5 se muestran picos bien definidos con bajo ruido de fondo alrededor de los 0.5V. El potencial de aparición de los picos es altamente estrecho, teniendo su punto máximo de forma casi alineada.

Al comparar los picos de oxidación obtenidos con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion y los obtenidos con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, estos últimos se presentan con una gran cantidad de ruido de fondo en relación con la densidad de corriente del pico de oxidación obtenida para cada una de las concentraciones evaluadas; al usar la

tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion la relación del ruido de fondo mejora notablemente mostrando picos más definidos con una baja contribución del ruido de fondo. En comparación con las señales obtenidas con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion en soluciones de vainillina en buffer de fosfatos pH 6.5, los picos de oxidación se aprecian ligeramente más anchos para las pruebas realizadas en soluciones de vainillina en leche entera.

El control, es decir, la evaluación electroquímica realizada en leche en ausencia de vainillina, nos muestra que la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion no exhibe ningún pico de oxidación o detección de alguna otra sustancia presente en la leche entera, por lo que podemos descartar que los picos sean una sumatoria de alguna contribución de algún otro compuesto presente en la leche evaluada.

El primer pico de oxidación corresponde a una solución de vainillina 0.2 mM en leche entera, para el cual se obtuvo una densidad de corriente de 7.305 μA ; por otro lado, el pico de oxidación más alto corresponde a una concentración de vainillina 3.4 mM en leche para el cual se obtuvo una densidad de corriente de 70.97 μA . Se observa un aumento de densidad de corriente de alrededor 8 μA . Este comportamiento nos permite observar que para las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) se exhibe el efecto contrario que se pudo observar en el comportamiento de las voltamperometrías cíclicas (CV) con respecto al crecimiento de la densidad de corriente en relación al aumento de concentración de vainillina.

En este caso un punto importante a considerar es el factor del ruido de fondo, que como se aprecia en los voltamperogramas obtenidos con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, es bastante significativo. Al hacer la comparativa podemos suponer que para las voltamperometrías de pulso diferencial la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion tiene un mejor comportamiento ya que es probable que tenga una detección más específica y selectiva, filtrando el ruido de fondo presente en la leche donde se realizan las pruebas de concentración de vainillina.

En 33b se ilustra el comportamiento de las densidades de corriente obtenidas para cada concentración de vainillina en soluciones de leche entera, utilizando la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como material de detección. Los datos reales obtenidos se ajustan muy bien a la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal, para la cual se

obtuvo una pendiente de $19.785 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$ y una intercepción de $3.221 \mu\text{A}$, mostrando un valor de $R^2=0.9998$. Esto muestra notoriamente una mejoría en la linealidad obtenida con respecto al comportamiento mostrado en la oxidación de vainillina con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion en las mismas soluciones de vainillina en leche. Esto nos permite suponer que integrar los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio (LDH) ayuda al sistema a tener una mayor estabilidad en la detección de la vainillina con un bajo ruido de fondo por lo que también podemos observar que al integrar el material de soporte se mejora la sensibilidad de las detecciones.

Para evaluar la reproducibilidad del sistema de detección integrado por el electrodo de carbón vítreo recubierto con la tinta de LDH- AuNP/carbón vulcan-Nafion se realizaron las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) por triplicado para cada una de las concentraciones de vainillina, la variabilidad de las densidades de corriente obtenidas en los picos de oxidación para cada una de las concentraciones se muestra en la figura 33b mediante las barras de error.

Las barras de error muestran variaciones estrechas, teniendo valores muy parecidos entre ellas. Para determinar la variación entre los datos obtenidos se calculó la desviación estándar relativa promedio de cada una de las variaciones en las concentraciones. El valor obtenido para la desviación estándar relativa fue de 1.96799% mientras que la desviación estándar promedio fue de 0.56337 . Al comparar estos dos valores con los obtenidos en los voltamperogramas resultantes de la oxidación de vainillina detectada por la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, notamos que ambos sistemas cuentan con valores muy similares por lo que la reproducibilidad en ambos sistemas podríamos considerar que tienen el mismo nivel de confiabilidad.

En cuanto al límite de detección alcanzado mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV) para la detección de vainillina en soluciones de leche entera, se consideró el criterio $3S_b/m$, donde S_b es la desviación estándar. El límite de detección obtenido fue de 0.1746 mM . Esto nos permite asegurar que el material tendrá la capacidad de detectar la vainillina a concentraciones por debajo de las que encontramos en los productos comerciales objetivo, cuya concentración mínima es de 0.6 mM .

11.3.5 Voltamperometrias ciclicas (CV) con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion en helado

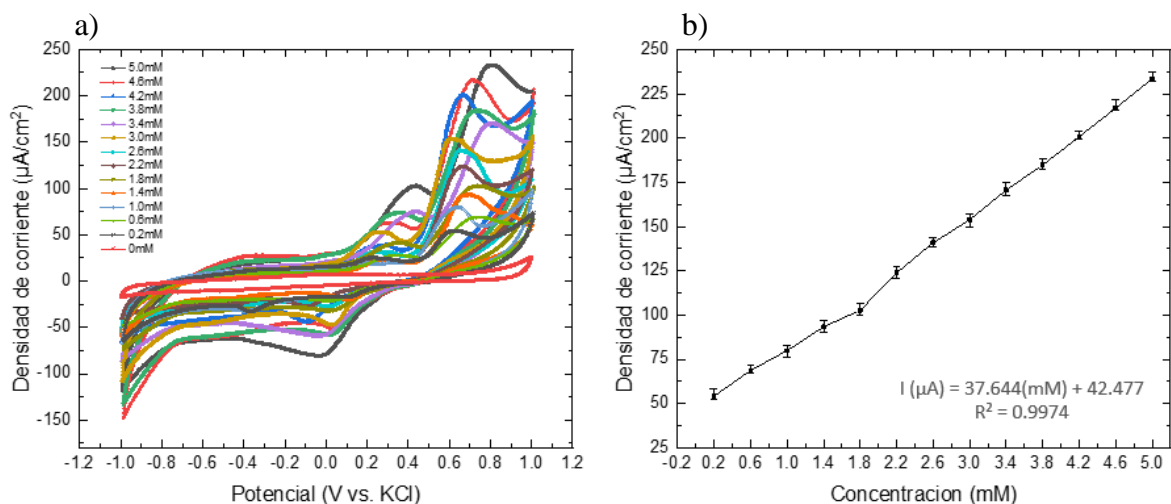


Figura 34. a) voltamperogramas cíclicos (CV) de soluciones de vainillina de 0 a 5.0 mM en helado con concentraciones conocidas de vainillina una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Finalmente, el comportamiento electroquímico de la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion fue evaluado en soluciones de vainillina en helado de crema. Los experimentos se realizaron en helado elaborado en el laboratorio utilizando las mismas proporciones de azúcar común, leche entera (marca Araceli), crema para batir (marca Lyncott) que se usaron al hacer la evaluación de la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion: 0.5:1:3, respectivamente. Esto con el propósito de que al tener soluciones estandarizadas de concentración y composición podamos tener comparativas más precisas.

Al tener un helado sin ningún saborizante añadido y hecho en el laboratorio podemos tener muestras de concentración conocida y podemos observar mejor el comportamiento de la oxidación de vainillina. De la misma forma que en los experimentos previos, se realizó una muestra con la concentración máxima de vainillina evaluada y a partir de ella se tomaron alícuotas para generar el resto de concentraciones, por lo que fue necesario hacer dos muestras de helado: una con la concentración máxima de vainillina (5mM; se utilizó vainillina grado químico 99%, ChemCenter) y otra en ausencia de vainillina y a partir de las dos se obtuvieron todas las concentraciones de vainillina evaluadas.

Todos los ingredientes se mezclaron perfectamente aplicando un mezclado en frío por aproximadamente 90 minutos. Este proceso permitió incorporar el aire y lograr la textura de un helado firme. Estas muestras de helado se usaron para llevar a cabo la voltamperometría cíclica (CV) como la voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

En la figura 34a se ilustran las voltamperometrías cíclicas (CV) obtenidas al evaluar concentraciones de vainillina de 0 a 5mM en muestras de helados de crema, con un aumento de concentración de 0.4 mM entre cada concentración.

Las respuestas electroquímicas fueron medidas a 20 mV/s en una ventana de potencial entre -1.0 hasta 1.0 V, y se consideró como referencia un electrodo de KCl. El área del electrodo de trabajo se normalizo a 1. De forma inicial, se evalúa el comportamiento de la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan en una muestra en ausencia de vainillina que nos permite tener un control. En este caso se observa una curva estrecha con un crecimiento de baja intensidad entre -0.4 y 0.3 V en el sentido de atrás hacia adelante, lo que podemos atribuir a posibles contribuciones poco significativas relacionadas a los componentes de los ingredientes del helado.

La aparición de los picos de oxidación se muestra en un rango de potencial más disperso, de entre 0.5 a 0.8 V, en comparación con los realizados en evaluaciones en soluciones de buffer o leche entera. Este comportamiento resulta lógico al recordar que al disminuir el pH de la solución evaluada los picos de oxidación se ven desplazados a potenciales mayores (Cagri, et. al., 2018), y en este caso el pH de la crema al tener un valor de alrededor de 4, hace que el pH ligeramente ácido que teníamos con el buffer pH 6.5 o con la leche (pH 6.6 – 6.8) se vea disminuido.

Los picos de oxidación de la vainillina se encuentran bien definidos en la mayoría de las concentraciones, por lo que es posible suponer que la vainillina mantiene una buena interacción con la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion. Se observa que alrededor de 0.3 V hay aparición de señales que, en algunas curvas se presentan de forma más intensa que en otras sin guardar una relación proporcional al aumento de vainillina por lo que podemos suponer que estos picos de oxidación pueden ser atribuidos a oxidaciones de otras moléculas contaminantes presentes en las soluciones de vainillina.

La densidad de corriente obtenida para la primera concentración (vainillina 0.2mM) fue de 54.31 μA , mientras que para la muestra de mayor concentración de vainillina (0.5 mM) la densidad de corriente tuvo un valor de 233.53 μA , teniendo un aumento de densidad de corriente alrededor de 13 μA entre una concentración y otra.

La curva obtenida mediante regresión lineal de las densidades correspondientes a cada concentración evaluada, respectivamente, se ilustra en la figura 34b. La linealidad se describe mediante $R^2=0.9974$; en la mayoría de las concentraciones se observa que se tiene una buena linealidad, salvo por para la concentración de 1.8 mM donde se observa que la densidad de corriente no aumentó de manera proporcional con el aumento que se estaba teniendo a concentraciones inferiores. La ecuación de diseño de la curva de calibración muestra que se obtuvo una pendiente de 37.664 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y una intercepción de 42.477 μA .

Para la evaluación de la reproducibilidad de esta técnica como método de detección y cuantificación de vainillina en helados de crema utilizando la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion se realizó una comparativa entre los picos de oxidación en tres curvas diferentes para evaluar la variabilidad que se presentó en cuanto a la densidad de corriente obtenida para cada una de las concentraciones evaluadas. Estos resultados se ilustran en las barras de error donde podemos observar que en todos los casos se mantiene un ancho de barra de error parecido, no muestran una variabilidad significativa y tampoco se observa traslapamiento entre densidades de corriente que pudieran generar alguna ambigüedad entre la densidad de corriente esperada para una concentración u otra.

Para evaluar este comportamiento se calculó la desviación estándar relativa cuyo valor fue de 2.58787% mientras que la densidad estándar fue de 3.0238. Esto nos permite confirmar que el sistema presenta una menor precisión al aumentar otros componentes a la muestra que se está evaluando porque pueden existir contribuciones entre las señales obtenidas, ruidos de fondo o tiene una mayor facilidad de contaminarse al tratarse de muestras con más diversidad de componentes. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con la tinta de AuNP/carbón vulcan-Nafion, se observa que para las mismas muestras de vainillina en helado de crema, estos últimos presentan mayor variabilidad teniendo una desviación estándar de 4.6917% y una desviación estándar de 5.0599, por lo que podemos inferir que el sistema de soporte provisto por los hidróxidos doble laminares de Magnesio y aluminio si

presentan una mejoría en cuanto a la estabilidad del sistema para obtener señales con menor variabilidad.

El límite de detección se calculó de 0.21607 mM, de forma que mediante esta técnica electroquímica aún resulta posible cuantificar la concentración de vainillina en productos lácteos comerciales objetivo (leche saborizada y helados de crema), ya que el límite de detección aún se conserva por debajo del rango de concentración para este tipo de productos.

11.3.6 Voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) con la tinta de LDH-AuNP/carbón-vulcan-Nafion en helado

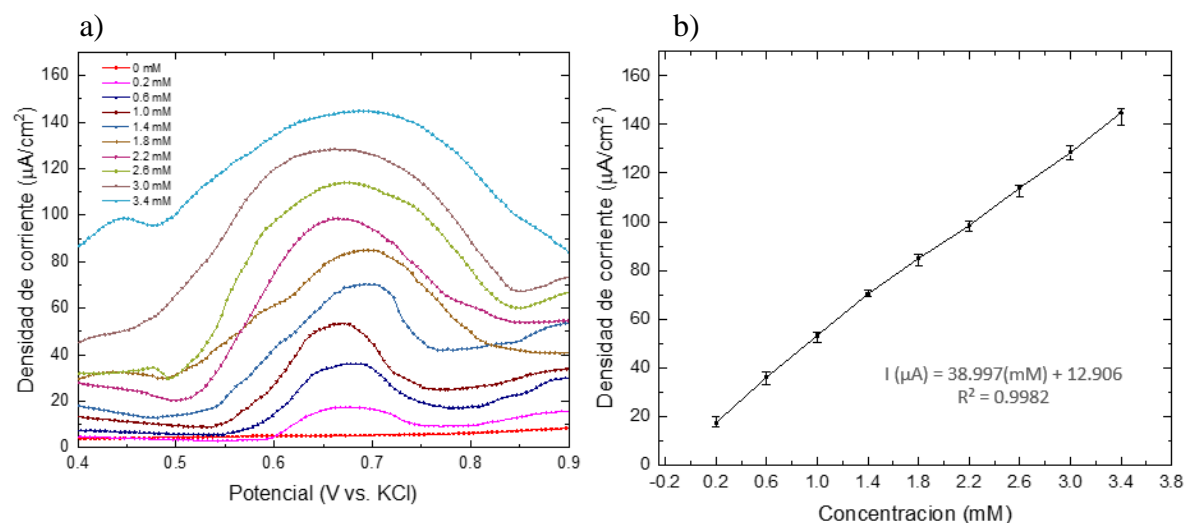


Figura 35. a) voltamperogramas de pulso diferencial (DPV) de soluciones de vainillina de 0 a 3.4 mM soluciones de helado con concentraciones de vainillina conocidas usando una tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion como sensor. b) Linealidad de las señales de corriente en los voltamperogramas obtenidos en a).

Como última evaluación se realizó voltamperometría de pulso diferencial (DPV) en muestras de helado con concentración de vainillina conocida en un rango de 0 a 3.4 mM, con un aumento de concentración de 0.4 mM, utilizando la tinta de LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion depositada por *drop casting* sobre el electrodo de carbón vítreo.

Las condiciones de evaluación fueron las mismas que se usaron los voltamperogramas anteriores, con el propósito de tener comparativas bajo las mismas condiciones y tener parámetros más controlados. Las pruebas se realizaron con un tamaño de escalon de 5 mV, un tamaño de pulso de 20 mV, un periodo 0.2 s y un tiempo de pulso de 0.05 s. Se abrió la

ventana de exploración del potencial de 0.4 a 0.9 V y en todas las pruebas realizadas, el área del electrodo se consideró igual a 1.

En la figura 35a se muestra el comportamiento electroquímico de la vainillina en helados de crema utilizando LDH-AuNP/carbon vulcan como material de sensorado.

De la misma forma que en los voltamperogramas cíclicos (CV) se logra apreciar que los picos de oxidación presentan un corrimiento en el potencial donde se presentaron, lo cual podemos atribuirlo a la reducción de pH, a consecuencia de la integración de la crema que presenta por sí misma un pH de alrededor de 4 y, por lo tanto, el pH ligeramente ácido que se tenía con la leche, se ve reducido. La aparición de los picos de oxidación se presentan alrededor de los 0.65V. Se mantuvo una consistencia en el potencial en el que aparecieron los picos de oxidación en el rango de concentraciones evaluado, teniendo un alineamiento bastante estrecho en el punto máximo del pico de oxidación.

El control, es decir, la evaluación de helado en ausencia de vainillina, se muestra sin presencia de algún pico o señal proveniente de algún componente presente en alguno de los ingredientes utilizados en la preparación del helado. Los voltamperogramas presentan un ancho de pico mayor en comparación con los picos de oxidación obtenidos en soluciones de buffer de fosfatos pH 6.5 o en leche, lo que podemos suponer puede ser consecuencia de la resistencia generada por la incorporación de aire y la posible contribución de alguna reacción generada entre algún componente del helado y la vainillina oxidada, sin embargo, los picos se consideran bien definidos en comparación con los obtenidos con la tinta de AuNP/carbon vulcan-Nafion, donde se percibe un mayor ruido de fondo y picos más suavizados.

El primer pico de oxidación, correspondiente a vainillina 0.2 mM en helado de crema, presenta una densidad de corriente de 17.43 μA , mientras que para la concentración más alta correspondiente a vainillina 3.4 mM en helado de crema se tiene un pico de oxidación con una densidad de corriente de 144.84 μA , teniendo un aumento de densidad de corriente entre un pico de oxidación y otro de aproximadamente 16 μA . La ecuación de diseño obtenida mediante regresión lineal se ilustra en la figura 33b, cuya pendiente es de 38.997 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ y su intersección es de 12.906 μA .

El factor de correlacion nos muestra que la curva de calibracion presenta una linealidad de $R^2=0.9982$. Este valor nos demuestra que la curva de calibracion posee un nivel confiable de linealidad al encontrarse muy cerca del 1. En comparacion con los resultados obtenidos en la curva de calibracion de la vainillina en helados de crema con la tinta de AuNP/carbon vulcan-Nafion, ambas presentan una linealidad bastante parecida por lo que en terminos de linealidad no se observa una mejora sustancial entre ambos materiales.

La reproducibilidad de este metodo electroquimico usando la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-Nafion para la deteccion de vainillina se ilustra mediante las barras de error que nos muestran las densidad de corriente obtenidas en tres curvas para cada una de las concentraciones, respectivamente. En este caso se aprecia que las densidades de corriente superiores e inferiores distan entre ellas de una forma menos estrecha, siendo uno de los resultados con un comportamiento mas diversificado. Al calcular la desviacion estandar promedio para todo el rango de concentraciones, esta tuvo un valor de 3.8699, mientras que la desviacion estandar relativa promedio para el mismo rango de concentraciones de vainillina tuvo un valor de 6.6734%.

Al comparar estos resultados contra los resultados obtenidos con la tinta de AuNP/carbon vulcan-Nafion para el mismo rango de concentraciones en muestras de helados de crema, se puede observar que estos ultimos presentan una reproducibilidad mas confiable ya que tanto la desviacion estandar como la desviacion estandar relativa presentan valores menores, y por lo tanto podemos observar que estos muestran una mayor consistencia en la densidad de corriente obtenida para cada concentracion.

El limite de deteccion se calculo usando el criterio $3S_b/m$, donde m es la pendiente de la grafica de calibración y S_b es la desviación estándar de las señales obtenidas de la vainillina en el rango de concentración de 0 a 3.4 mM en helado de crema. El limite de deteccion se calculo de 0.2977 mM, el cual tambien es superior al compararlo contra el limite de deteccion alcanzado en el mismo rango de soluciones de vainillina en helados de crema cuantificado con el sensor de AuNP/carbon vulcan-Nafion cuyo limite de deteccion fue de 0.1114 mM.

Los resultados obtenidos mediante voltamperometria de pulso diferencial para la deteccion de vainillina en helados de crema usando la tinta de LDH- AuNP/carbon vulcan-Nafion no

parecen ser concluyentes por lo que se sugiere realizar mas experimentos para establecer conclusiones confiables y con un mayor respaldo experimental.

11.3 Comparacion entre materiales

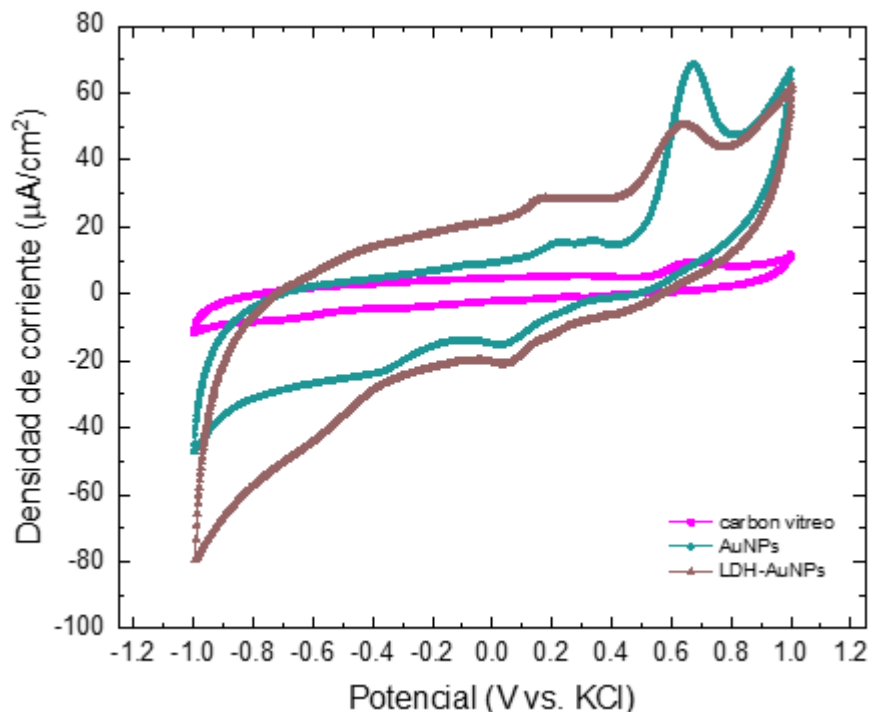


Figura 36. voltamperogramas cíclicos de una solución de vainillina 1.0 mM en buffer de fosfatos 0.01M pH 6.5. Se muestra la comparación en la obtención de la señal de corriente característica obtenida con el electrodo de carbón vítreo desnudo (curva rosa), el electrodo de carbón vítreo recubierto con la tinta de AuNPs (curva azul) y con el electrodo de carbón vítreo recubierto con la tinta de LDH-AuNPs (curva café).

Se realizó una comparativa de la respuesta en terminos de densidad de corriente obtenida para una misma concentracion de vainillina de 1.0mM en buffer de fosfatos pH 6.5 al llevarse a cabo la oxidacion, utilizando el electrodo desnudo, el electrodo recubierto con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion y la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion, respectivamente, para medir la respuesta electroquimica. Para llevar a cabo esta prueba se consideraron los parametros de experimentacion estandar llevados a cabo durante este proceso, los cuales fueron una velocidad de exploracion de 20 mV/s y una ventana de exploracion de potencial de -1.0 a 1.0V. Para esta comparativa se uso la curva 3 en todos los casos para tener una referencia mas precisa del comportamiento de los materiales.

En rosa se observa el comportamiento del electrodo de carbon vitreo sin ningun tipo de recubrimiento. En este caso la señal aparece cerca de los 0.62V, se tiene un pico suave, poco ruidoso y con inicio y fin de curva bien definido, pero con una baja densidad de corriente, alrededor de 8 μ A. No se observa una fuerte contribucion del ruido de fondo, ya que la curva por si misma se muestra estrecha.

En azul observamos la respuesta de densidad de corriente para la misma solucion de vainillina 1.0 mM. En este caso podemos observar que la curva se vuelve menos angosta y presenta detecciones en el rango de potencia de 0.1 a 0.4V de atrás hacia adelante y en el sentido opuesto notamos algunas señales menos alrededor de 0 V y -0.4V, que podrian representar la presencia de alguna sustancia contaminante o bien una reaccion de oxidacion de la vainillina oxidada o algun subproducto generado al llevar a cabo la oxidación. El pico de oxidacion se muestra bien definido, angosto y con una elevada densidad de corriente en comparacion con el electrodo de carbon vitreo sin recubrir. Para la solucion de vainillina 1.0mM en buffer de fosfatos pH 6.5, la densidad de corriente obtenida fue de 68.72 μ A.

En café se muestra la curva para la oxidacion de vainillina 1.0mM en buffer de fosfatos pH 6.5 detectada con el electrodo de carbon vitreo recubierto con la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion. Se muestra que la curva es mas ancha, se presentan señales suaves y ruidosas alrededor de 0.2 V y en el sentido opuesto aparece una señal alrededor de 0 V, que coincide con la obtenida con la tinta de AuNPs, pero con un aumento proporcional con el aumento de la concentracion de vainillina, de igual manera podriamos suponer qu esto podria guardar relacion con algun contaminante resultado de la manipulacion de la soluciones de vainillina como en el caso de la deteccion de vainillina con el electrodo de AuNP/carbon vulcan-Nafion.

El pico de oxidacion obtenido con la tinta de LDH de AuNP/carbon vulcan-Nafion presenta una menor densidad de corriente, cuyo valor es de 25.78 μ A. Se observa que al tener un mayor ensanchamiento de la curva y un bajo aumento de densidad de corriente podemos suponer que esta guarda relacion con el fenomeno descrito en la figura 28 donde se presenta la posible hipotesis de que estos dos hechos pueden estar relacionados a que la tinta de LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion pueda ser mas sensible a las contribuciones de posibles

contaminantes o subproductos y que al tener un sistema de varias capas de hidroxidos doble laminares se genere una resistencia entre ellas al momento de llevar a cabo la oxidacion.

Las evaluaciones muestran que las propiedades sinérgicas del electrodo de carbono vítreo con ambas tintas mejoran significativamente en comparación con las propiedades electroquímicas del sensor de carbono vítreo por sí mismo. Ambos materiales proporcionan al sensor un área altamente reactiva que se traduce en una respuesta de intensidad de corriente más alta al detectar la oxidación de la vainillina. De esta manera, es posible detectar variaciones más pequeñas, lo que también permite mejorar la sensibilidad del sensor en comparación con el electrodo de carbón vítreo. A su vez otorga un tiempo de respuesta rápida y bajo costo, en relación con los métodos convencionales de detección de vainillina en la industria alimentaria (Guo,2007).

Por otro lado, una comparativa del comportamiento de los sensores evaluados en este trabajo, tanto AuNP/carbon vulcan-nafion como LDH-AuNP/carbon vulcan-nafion con otros electrodos desarrollados para la detección de vainillina, se muestra en la tabla 4. En ella podemos apreciar en primer lugar el límite de detección y rango de operación obtenidos para los dos materiales desarrollados en esta tesis.

Tabla 4. Tabla comparativa rango de operación y límite de detección de electrodos destinados a la detección de la vainillina (natural y sintética) en diferentes productos.

Electrodo	Muestra	Límite de detección	Rango de operación	Referencia
AuNPs	Vainillina en buffer de fosfatos	0.0377 mM	0.1 - 4.2 mM	Este trabajo de tesis
	Leche sabor vainilla	0.1048 mM	0.2 - 3.4 mM	Este trabajo de tesis
	Helado de vainilla	0.1114 mM	0.2 - 3.8 mM	Este trabajo de tesis
LDH-AuNPs	Vainillina en buffer de fosfatos	0.0624 mM	0.1 - 3.4 mM	Este trabajo de tesis
	Leche sabor vainilla	0.1746 mM	0.2 - 3.4 mM	Este trabajo de tesis

	Helado de vainilla	0.1821 mM	0.2 - 3.4 mM	Este trabajo de tesis
CFME cylindrical	vainillina en acetato de etilo	4.2 μ M	10-700 μ M	(Agui et al., 1999)
Graphite electrode	Vainillina en etanol, yogurt y copotas	0.4 μ M	5-400 μ M	(Bettazzi et al., 2006)
Vitreous carbon	vainillina natural en etanol y acetato de etilo	0.16 μ M	50-300 μ M	(Hardcastle et al., 2001)
PVC/graphite	Vainillina en H ₂ SO ₄ , vainilla azucarada, galleta de chocolate y chocolate	0.29mM	0.66-9.2mM	(Luque et al., 2000)
Carbon fiber microelectrode /Au-AgNPs/Carbon vitreous	vainas de vainilla en buffer, te de vainilla	0.04 μ M	0.2-50 μ M	(Zheng et al., 2010)
Graphene/Vitreous carbon	Galletas	0.056 μ M	0.1-7 μ M	(Peng et al., 2012)
AuPd-graphene/vitreous carbon	vainas de vainilla en buffer, te de vainilla, galletas	0.02 μ M	10-40 μ M	(Shang et al., 2014)

Se logra apreciar que en los tres tipos de muestras (soluciones de buffer de fosfatos, leche sabor vainilla y helado de crema sabor vainilla) el limte de deteccion esta por debajo de la concentracion minima de vainillina encontrada en los productos objetivo, cuyo valor es de al menos 0.6 mM, mientras que en el rango de operaci3n se comprob3 que el sensor es sensible para todos los casos al menos hasta una concentracion de 3.4 mM, valor que resulta superior a la concentracion maxima de vainillna encontrada en leche saborizada y helados de crema, que es de 3.3 mM.

Al comparar los dos materiales podemos observar que los limites de deteccion mas bajos los presenta el sensor elaborado con el electrodo de carbon vitreo recubierto con la tinta de AuNP/carbon vulcan-nafion, sin embargo al trabajar con los dos materiales es importante observar que el electrodo de carbon vitreo recubierto con la tinta de LDH- AuNP/carbon vulcan-nafion presenta picos de oxidacion mas agudos en la mayoria de los casos por lo que

podemos asociar a que este podría presentar una mejor estabilidad y sensibilidad de la vainillina, de forma que el ruido de fondo no se vuelve tan significativo y aporta resultados más específicos.

Al observar los límites de detección y rango de operación de vainillina de otros sensores reportados en la literatura podemos observar que aunque si bien, estos pueden llegar alcanzar valores más cercanos al cero, ninguno de ellos fue probado en un producto como leche saborizada o helado de crema y, por otro lado, los rangos de operación no son funcionales dentro del rango de detección objetivo en el desarrollo de esta tesis, por lo que se considera a los dos materiales evaluados como opciones viables para la detección de vainillina en leche saborizada y helados de crema en las concentraciones de vainillina comerciales (0.6 – 3.3 mM).

10 Conclusión

En este trabajo de tesis, las nanopartículas de oro (AuNP) y las nanopartículas de oro soportadas en los hidróxidos doble laminares de magnesio y aluminio (LDH-AuNP) fueron sintetizadas por reducción química y coprecipitación, respectivamente; fueron caracterizadas fisicoquímicamente por técnicas SEM y XRF, lo que nos permitió observar la distribución, presencia, forma y un tamaño aproximado de partícula. Las propiedades electrocatalíticas de los materiales sintetizados fueron evaluadas al llevar a cabo la electrooxidación de vainillina mediante voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

Como objetivo de la investigación el propósito fue evaluar propuestas de materiales para el posterior desarrollo de un sensor amperométrico específicamente para las industrias de helados y bebidas lácteas saborizadas, ya que estos productos son aquellos a los que se dirige la mayor parte de la vainillina en la industria alimentaria. Parte del propósito fue asegurar que en las condiciones de las muestras fuese posible detectar las concentraciones reales en las cuales se encuentra la vainillina en estos productos. Los voltamperogramas fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones experimentales (temperatura ambiente, 25°C aprox.).

Las AuNPs y las LDH-AuNPs exhibieron buena estabilidad durante el desarrollo de los experimentos. El electrodo de carbón vítreo modificado con ambas tintas, respectivamente, muestra una actividad electrocatalítica mejorada para la determinación cuantitativa sensible de vainillina mediante su oxidación debido a los efectos sinérgicos de tanto las AuNPs o LDH-AuNP con el electrodo de carbón vítreo, que permiten tener un aumento en la conductividad electrónica y un área superficial electroactiva. Ambos materiales resultaron ser sensibles y selectivos, sin embargo, presentaron propiedades diferentes, donde las AuNPs alcanzaron una mayor densidad de corriente asociada con la reacción de oxidación de la vainillina, mientras que el sensor realizado con la tinta de LDH-AuNPs tuvo respuestas ser más sensibles y estables.

Las voltamperometrías cíclicas y de pulso diferencial muestran que, bajo las condiciones de trabajo a condiciones ambientales, en las sustancias objetivo y a su respectivo pH, el pico de corriente incrementa de forma lineal en cada uno de los casos. Adicionalmente se considera que el haber usado el Nafion como material para hacer la deposición de la tinta ayudó a incrementar la conductividad de las nanopartículas soportadas en el carbón vulcan, por lo que se considera que al combinar la capacidad de intercambio iónico del Nafion (ionómero) con la actividad catalítica y propiedades superficiales específicas de las tanto AuNPs como de las LDH-AuNPs, el sensor electroquímico resultó tener un alto grado de sensibilidad y selectividad en la determinación de vainillina en muestras de buffer, leches saborizadas y helados, en comparación con el electrodo desnudo.

El pH óptimo en el que se trabajó fue un pH ligeramente ácido de 6.5, debido a que es el pH de las muestras que se busca analizar. Tener un pH ácido contribuyó a tener iones hidrógeno libres y promover la reacción de oxidación de la vainillina. Los rangos de calibración lineal para la vainillina obtenidos en estas condiciones fueron en concentraciones de 0.1 a 1.0 mM, y posteriormente de 1.0 a 3.4 mM, ya que evaluar estas concentraciones nos permitieron evaluar el rango presente en los productos comerciales objetivo (0.6 mM a 3.3 mM).

En todos los casos el factor de correlación mostró una buena linealidad, donde tanto la linealidad en las voltamperometrías cíclicas (CV) como la de las voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) presentan el comportamiento esperado ya que en todos los casos el factor de correlación tuvo valores muy cercanos al 1, de la misma forma en todos los casos la

desviación estándar no resulto considerablemente significativa y los límites de detección alcanzados con cada una de las evaluaciones en los diferentes medios fue menor al que se encuentra en las leche saborizadas y helados comerciales. Sin embargo, se recomienda realizar más evaluaciones experimentales para confirmar que presenta un reparto lineal para todas las concentraciones a evaluar y que se tenga una adecuada reproducibilidad. Las evaluaciones se realizaron de forma rápida y sencilla, lo que confiere a la técnica una solución al área de oportunidad dentro de las industrias alimentarias en el tema de la cuantificación de la vainillina.

Tanto el análisis voltamperométrico de pulso diferencial como el voltamperométrico cíclico ya ha sido reportados en la literatura, sin embargo, en la mayoría de los casos las mediciones se han realizado en extractos o en soluciones en solventes orgánicos. En este trabajo además de que se evitó el uso de solventes orgánicos, también se realizaron las pruebas dentro de muestras en los productos objetivos (helado y leche saborizada) en rangos de concentraciones reales. El propósito fue asegurar que en las condiciones de las muestras fuese posible detectar las concentraciones reales en las cuales se encuentra la vainillina en estos productos.

Es importante mencionar que a través del desarrollo de este trabajo se puede concluir este método nos ofrece la posibilidad de llevar a cabo la detección y determinación de concentración de vainillina directamente en las muestras de helado o leche saborizada, lo que simplifica considerablemente el procedimiento analítico. Esta técnica presenta las ventajas añadidas de su resistencia a la suciedad superficial, su fácil manejo y su bajo coste. Se concluye que se pueden desarrollar métodos electroanalíticos más sensibles utilizando técnicas de voltamperometría junto con un recubrimiento de ya sea, AuNP/carbón vulcan-Nafion o LDH-AuNP/carbón vulcan-Nafion. Otro aspecto interesante desde un punto de vista práctico es que, a pesar de la sensibilidad/fragilidad de la técnica, no es necesario tomar precauciones especiales para manipular los electrodos durante el tiempo de trabajo.

Este trabajo proporciona una plataforma útil para la preparación de sensores basados en AuNPs o LDH-AuNPs y su posterior construcción en dispositivos independientes. En conclusión, el electrodo preparado modificado puede ser exitosamente usado para la determinación voltamperométrica de vainillina en análisis de muestras reales y sintéticas con una excelente sensibilidad y propiedades antiicrustantes. El desarrollo del electrodo puede

ser fácilmente fabricado y el proceso de preparación es rápido en comparación con otras técnicas.

11 Referencias

Zheng, D., Hu, C., Gan, T., Dang, X., & Hu, S. (2010). Preparation and application of a novel vanillin sensor based on biosynthesis of Au-Ag alloy nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 148(1), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.04.031>

Cervantes-Castillo, A., Lima-Morales, M., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., Arévalo-Galarza, G. A., Soto-Hernandez, R. M., García-Osorio, C., Arévalo-Galarza, L. (2018). Quality evaluation of *Vanilla planifolia* (Jacks. ex Andrews) beans from the Huasteca Potosina, México. *Nova Scientia*. N° 21, Vol. 10 (2), 2018. ISSN 2007 – 0705, pp.: 360 – 378 doi.org/10.21640/ns.v10i21.1586

Hernández-Hernández, J. (2011). Agricultural Systems and curing- Production of Vanilla. *Handbook of Vanilla Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1 405-19325-2

Anklam, E., Gaglione, S., & Müller, A. (1997). Oxidation behaviour of vanillin in dairy products. *Food Chemistry*, 60(1), 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00299-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00299-3)

Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505–515. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3)

Cheraghi, S., Taher, M. A., & Karimi-Maleh, H. (2017). Highly sensitive square wave voltammetric sensor employing CdO/SWCNTs and room temperature ionic liquid for analysis of vanillin and folic acid in food samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.006>

Anti-sickling.” Merriam-Webster.com Medical Dictionary, Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/medical/anti-sickling>. Accessed 17 Nov. 2021.

Alpar, N., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2018). Selective and simultaneous determination of total chlorogenic acids, vanillin and caffeine in foods and beverages by adsorptive stripping

voltammetry using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. In *Sensors and Actuators, B: Chemical* (Vol. 257). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.100>

Silva, T. R., Brondani, D., Zapp, E., & CruzVieira, I. (2015). Electrochemical Sensor Based on Gold Nanoparticles Stabilized in Poly(Allylamine hydrochloride) for Determination of Vanillin. *Electroanalysis*, 27(2), 465–472. <https://doi.org/10.1002/elan.201400517>

Bensaid, F. F., Wietzerbin, K., & Martin, G. J. (2002). Authentication of natural vanilla flavorings: Isotopic characterization using degradation of vanillin into guaiacol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6271–6275. <https://doi.org/10.1021/jf020316l>

Sinha, A. K., Sharma, U. K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299–326.

Zheng, L., Zheng, P., Sun, Z., Bai, Y., Wang, J., & Guo, X. (2007). Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technology*, 98(5), 1115–1119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.028>

Hernández-Hernández, J., Curti-Díaz, S. A., & Ríos-Utrera, Á. (2019). Retention of Vanilla planifolia Jacks ex Andrews fruits with growth regulators. *Agronomy Mesoamerican*, 30(3), 695–704. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.33988>

Luis-Rojas, S., Ramírez-Valverde, B., Díaz-Bautista, M., Pizano-Calderón, J., & Rodríguez-López, C. (2020). La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: análisis y pronóstico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 175–187. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2065>

Bettazzi, F., Palchetti, I., Sisalli, S., & Mascini, M. (2006). A disposable electrochemical sensor for vanillin detection. *Analytica Chimica Acta*, 555(1), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.069>

Jiang, L., Ding, Y., Jiang, F., Fan, L., Mo, F. (2014). Electrodeposited Nitrogen-Doped Graphene/Carbon Nanotubes Nanocomposite as Enhancer for Simultaneous and Sensitive

Voltammetric Determination of Caffeine and Vanillin. *Analytica Chimica Acta*. PII: S0003-2670(14)00582-0 DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.aca.2014.05.010>

Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2013). *Ice Cream*. 7th Edition. Springer. ISBN 978-1-4614-6096-1 (eBook) DOI 10.1007/978-1-4614-6096-1

Vilian, A. T. E., Puthiaraj, P., Kwak, C. H., Hwang, S. K., Huh, Y. S., Ahn, W. S., & Han, Y. K. (2016). Fabrication of Palladium Nanoparticles on Porous Aromatic Frameworks as a Sensing Platform to Detect Vanillin. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(20), 12740–12747. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03942>

Ziyatdinova, G. K., Antonova, T. S., Mubarakova, L. R., Budnikov, H. C. (2018). An Amperometric Sensor Based on Tin Dioxide and Cetylpyridinium Bromide Nanoparticles for the Determination of Vanillin. ISSN 1061-9348, *Journal of Analytical Chemistry*, 2018, Vol. 73, No. 8, pp. 801–808.

Zhang, J., Wang, L. P., Guo, W., Peng, X. D., Li, M., Yuan, Z. B. (2011). Sensitive Differential Pulse Stripping Voltammetry of Caffeine in Medicines and Cola Using a Sensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes and Nafion. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 997 - 1006

Paladiya, C., & Kiani, A. (2018). Nano structured sensing surface: Significance in sensor fabrication. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 268, 494–511. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.085>

Baex-Gaxiola, M. R. (2017). Integración de sensores electroquímicos basados en nanomateriales funcionales para la detección de contaminantes en aguas. Universitat Politècnica de Catalunya. Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Disponible en: <http://www.tdx.cat/?localeattribute=es>

Malkov, V. B., Zachman, B., & Scribner, T. (2009). Comparison of on-line chlorine analysis methods and instrumentation built on amperometric and colorimetric technologies. *Water Quality Technology Conference and Exposition 2009*, 30–51.

JoVE Science Education Database. Química analítica. Cyclic Voltammetry (CV). JoVE, Cambridge, MA, (2021)

Wang, X., Luo, C., Li, L., Duan, H. (2015). An ultrasensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene oxide/ carboxylated multiwalled carbon nanotube/ionic liquid/gold nanoparticle composites for vanillin analysis. *Royal Society of chemistry. RSC Adv.*, 2015, 5, 92932

Agui, L., Lopez.Guzman, J. E., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Senedo, P., & Pingarron., J, M. (1999). Analytical performance of cylindrical carbon fiber microelectrodes in low-permittivity organic solvents: determination of vanillin in ethyl acetate. *Analytica Chimica Acta*, 385(6), 241–248.

Hardcastle, J. L., Paterson, C. J., & Compton, R. G. (2001). Biphasic sonoelectroanalysis: Simultaneous extraction from, and determination of vanillin in food flavoring. *Electroanalysis*, 13(11), 899–905. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200107\)13:11<899::AID-ELAN899>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200107)13:11<899::AID-ELAN899>3.0.CO;2-E)

Luque, M., Luque-Pérez, E., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2000). Supported liquid membranes for the determination of vanillin in food samples with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 410(1–2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00737-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00737-6)

Peng, J., Hou, C., & Hu, X. (2012). A Graphene-Based Electrochemical Sensor for Sensitive Detection of Vanillin. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 1724–1733.

Shang, L., Zhao, F., & Zeng, B. (2014). Sensitive voltammetric determination of vanillin with an AuPd nanoparticles-graphene composite modified electrode. *Food Chemistry*, 151, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.044>

Li, R., Yang, T., Li, Z., Gu, Z., Wang, G., & Liu, J. (2017). Synthesis of palladium@gold nanoalloys/nitrogen and sulphur-functionalized multiple graphene aerogel for electrochemical detection of dopamine. *Analytica Chimica Acta*, 954, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.031>

Ying, J., Li, J., Jiang, G., Cano, Z. P., Ma, Z., Zhong, C., Su, D., & Chen, Z. (2018). Metal-organic frameworks derived platinum-cobalt bimetallic nanoparticles in nitrogen-doped hollow porous carbon capsules as a highly active and durable catalyst for oxygen reduction reaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 225, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.077>

Guo, S., & Wang, E. (2007). Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 598(2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.054>

Cao, H., Yang, A., Li, H., Wang, L., Li, S., Kong, J., Bao, X., & Yang, R. (2015). A non-enzymatic glucose sensing based on hollow cuprous oxide nanospheres in a Nafion matrix. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 214, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.026>

Mirsky, V. M., & Yatsimirsky, A. K. (n.d.). Edited by Molecular Plasmonics Biosensor Nanomaterials Nuclear Receptors as Drug Targets Series: Nanomaterials for the Life Sciences (Volume 7) Modern Supramolecular Chemistry Handbook of Biosensors and Biochips Mass Spectrometry of Non-Covalent Comple.

Martinez, D. R. & Carbajal, G. G. (2012). Hidroxidos doble laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *A vances en Química*, 7(1), 87-99

Cuevas-Muñiz F. M., Guerra-Balcazar, M., Castaneda, F., Ledesma-García, J., Ariaga, L. G. (2011). Performance of Au and AuAg nanoparticles supported on Vulcan in a glucose laminar membraneless microfuel cell. *Journal of Power Sources* 196 (2011) 5853–5857

Shah, M., Badwaik, V. D., & Dakshinamurthy, R. (2014). Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 344–362. [doi:10.1166/jnn.2014.8900](https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8900)

Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., & Parak, W. J. (2008). Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1896. [doi:10.1039/b712170a](https://doi.org/10.1039/b712170a)

Parreira, P. S., Appoloni, C. R., Lobo-Vieira, R. M., Scorzelli, R. B., Le Corre, L., Guerra, M. F. (2009). Precious metals determination in ancient coins by portable ED-XRF spectroscopy with a ²³⁸Pu source. *OpenEdition Journals*, num. 313. p. 313 – 318. DOI: [10.4000/archeosciences.2396](https://doi.org/10.4000/archeosciences.2396)

- Pérez-Rodríguez, S., Pastor, E., & Lázaro, M. J. (2018). Electrochemical behavior of the carbon black Vulcan XC-72R: Influence of the surface chemistry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(16), 7911–7922. doi:10.1016/j.ijhydene.2018.03.040
- Liu, Z. Y., Zhang, J. L., Yu, P. T., Zhang, J. X., Makharia, R., More, K. L., & Stach, E. A. (2010). Transmission Electron Microscopy Observation of Corrosion Behaviors of Platinized Carbon Blacks under Thermal and Electrochemical Conditions. *Journal of The Electrochemical Society*, 157(6), B906. doi:10.1149/1.3391737
- Kögler, M., Ryabchikov, Y. V., Uusitalo, S., Popov, A., Popov, A., Tselikov, G., ... Kabashin, A. V. (2018). Bare laser-synthesized Au-based nanoparticles as nondisturbing surface-enhanced Raman scattering probes for bacteria identification. *Journal of Biophotonics*, 11(7), e201700225. doi:10.1002/jbio.201700225
- Hou, W., Wang, S., Wang, X., Han, X., Fan, H., Cao, S., ... Yu, S. (2015). Development of Colloidal Gold Immunochromatographic Strips for Detection of *Riemerella anatipestifer*. *PLOS ONE*, 10(3), e0122952. doi:10.1371/journal.pone.0122952
- Das, S. K., Dickinson, C., Lafir, F., Brougham, D. F., & Marsili, E. (2012). Synthesis, characterization and catalytic activity of gold nanoparticles biosynthesized with *Rhizopus oryzae* protein extract. *Green Chemistry*, 14(5), 1322. doi:10.1039/c2gc16676c
- Cvak, B., Pum, D., Molinelli, A., & Krska, R. (2012). Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices. *The Analyst*, 137(8), 1882. doi:10.1039/c2an16108g
- Naik, L., Sharma, R., Mann, B., Lata, K., Rajput, Y. S., & Surendra Nath, B. (2017). Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay. *Food Chemistry*, 219, 85–92. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.090
- Mei, Z., Deng, Y., Chu, H., Xue, F., Zhong, Y., Wu, J., ... Chen, W. (2012). Immunochromatographic lateral flow strip for on-site detection of bisphenol A. *Microchimica Acta*, 180(3-4), 279–285. doi:10.1007/s00604-012-0930-2

Hong, S. and Li, X. (2013). Optimal Size of Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy under Different Conditions. *Journal of Nanomaterials* Volume 2013, Article ID 790323. doi: 10.1155/2013/790323

Leifert, A., Pan-Bartnek, Y., Simon, U., & Jahn-Dechent, W. (2013). Molecularly stabilised ultrasmall gold nanoparticles: synthesis, characterization and bioactivity. *Nanoscale*, 5(14), 6224. doi:10.1039/c3nr00916e

Vaka, M. (2017). Synthesis and characterisation of graphene hybrid nanoarchitectures for potential sensing applications. Deakin University Australia Worldly.

Jedrzejczak-Silicka, M., Trukawka, M., Piotrowska, K., Mijowska, E. (2020). Few-Layered Hexagonal Boron Nitride: Functionalization, Nanocomposites, and Physicochemical and Biological Properties. IntechOpen, *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90528>