# Máster en Electroquímica. Ciencia y Tecnología

Trabajo Fin de Máster

# "Desarrollo y Caracterización de electrodos de carbón modificados con cobre para la determinación de capacidad antioxidante"

María Teresa Moreno Muñoz

Madrid, Julio de 2018



Máster en Electroquímica. Ciencia y Tecnología

María Teresa Moreno Muñoz

## 2018

"Desarrollo y Caracterización de electrodos de carbón modificados con cobre para la determinación de capacidad antioxidante."

Director: José Miguel Rodríguez Mellado.

Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada.

Universidad de Córdoba.

Fdo: María Teresa Moreno Muñoz. Fdo: José Miguel Rodríguez Mellado.

# Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	2
1.1 Objetivo y esquema del trabajo	10
2. Descripción de los materiales y procedimientos empleados	10
2.1 Instrumental	10
2.2 Electrodos	11
2.3 Disoluciones y Reactivos	11
2.4 Condiciones de Trabajo	12
3. Resultados obtenidos y discusión	13
3.1 Optimización de las condiciones de trabajo	13
3.2 Ensayos con antioxidantes	31
3.3 Caracterización con microscopía electrónica de barrido	
4. Conclusiones	
4b. Conclusions	43
5. Referencias	44

# Resumen

Los antioxidantes se utilizan en la conservación de alimentos. El desarrollo de métodos para evaluar capacidad antioxidante es un objetivo en los últimos años. Los métodos electroquímicos reportados recientemente presentan limitaciones relacionadas con la estabilidad en medios no acuosos y la complejidad de sus preparaciones. CUPRAC es un método espectrofotométrico basado en la reducción de Cu(II) a Cu(I), limitado por el color y la turbidez el pH de la muestra. El objetivo de este trabajo es investigar, desarrollar y caracterizar electrodos basados en la electrodeposición de cobre en electrodos de carbono vítreo (ECV), que puedan utilizarse como sensores para la capacidad antioxidante de una amplia gama de muestras.

Las condiciones óptimas para la limpieza del ECV fueron: mezcla crómica diluida, agua regia, seguido de un pulido mecánico con pasta de diamante, y dos tipos de alúminas (0.3 y 0.05 µm).

Se ha estudiado la reducción del Cu(II) mediante voltametría cíclica sobre ECV para establecer las condiciones óptimas de electrodeposición, la cual se realizó a partir de disoluciones de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en medios HNO<sub>3</sub> 0.5 M. El potencial y el tiempo de la electrodeposición se optimizaron. Los electrodos se estudiaron mediante voltametría cíclica en buffer fosfato a pH 7. La intensidad de voltagramas de pulso diferencial sucesivos disminuyó hasta estabilizarse. La estabilidad y reproducibilidad de los electrodos se estableció mediante el control de los picos anódico y catódico. Los electrodos se caracterizaron por SEM, antes y después del acondicionamiento.

En presencia de antioxidantes, la señal de reducción disminuye al aumentar la concentración de antioxidante. Se han medido las capacidades antioxidantes (CAO) de ácido ascórbico y ácido gálico, en equivalentes de trolox y están en la misma relación que las obtenidas por CUPRAC. Así, los electrodos propuestos son útiles para la determinación de capacidad antioxidante.

# Abstract

Antioxidants are frequently used in the conservation of foods. The development of new methods assessing the antioxidant capacity is a main target in last years. Some electrochemical methods have been recently reported, but they present limitations dealing with the stability in non-aqueous media and the complexity of their preparations. CUPRAC is a spectrophotometric method based in the reduction of Cu(II) to Cu(I), limited by the color and turbidity of the sample and the working pH. The aim of this work is to investigate, develop and characterize electrodes based on the electrodeposition of copper on glassy carbon electrodes (GCE), which can be used as sensors for the antioxidant capacity of a wide range of samples.

The optimal conditions for the cleaning of (GCE) were: diluted chromic mixture, aqua regia, followed by a mechanical polishing with diamond paste, and two types of aluminas (0.3 and 0.05  $\mu$ m). The reduction of Cu(II) on (GCE) has been studied by cyclic voltammetry to establish the optimal electrodeposition conditions, which was made from solutions of Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in 0.5M HNO<sub>3</sub> media. The potential and time of the electrodeposition were optimized. The electrodes were studied by cyclic voltammetry in phosphate buffer at pH 7. The intensity of successive differential pulse voltammograms decreased until they stabilized. The stability and reproducibility of the electrodes were characterized by SEM, before and after conditioning.

In the presence of antioxidants, the reduction signal decreases when the antioxidant concentration was increased. The antioxidant capacities (CAO) of ascorbic acid and gallic acid, in trolox equivalents, have been measured and are in the same relationship as those obtained by CUPRAC. Thus, the proposed electrodes are useful for the determination of antioxidant capacity.

#### 1. Introducción

En nuestro planeta hay gran cantidad de oxígeno y, por tanto, en la naturaleza hay una tendencia a la oxidación que puede observarse en los procesos de corrosión, enranciamiento de grasas, envejecimiento y deterioro de frutas, etc. Las reacciones de óxido-reducción son biológicamente relevantes ya que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a partir de ellas, por ejemplo, en la fotosíntesis y en el metabolismo aeróbico.

A pesar de que el oxígeno es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedades a través de una producción incontrolada de radicales libres entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS: "Reactive Oxygen Species"), que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) [1].

Un radical libre (RL) es una especie química, átomo, molécula o fragmento de molécula, con al menos un electrón desapareado, con alta reactividad y corta vida media. Su formación tiene causas endógenas y exógenas. El organismo los produce mediante procesos metabólicos naturales en los que interviene el oxígeno. También pueden formase por factores externos como radiación solar, contaminación ambiental, exposición a sustancias químicas, tabaco, alcohol y cambios de temperatura.

Los RL estabilizan su configuración electrónica cediendo o aceptando un electrón de otras moléculas, actuando respectivamente como reductores u oxidantes, o bien uniéndose covalentemente a una molécula estable. De este modo, el RL desestabilizan la configuración electrónica de la molécula con la que reacciona y causa la formación de un nuevo radical libre. También pueden formase radicales libres por ruptura homolítica de una molécula estable. Las reacciones en cascada, con formación continua de especies altamente reactivas, finalizan generalmente cuando dos radicales coinciden combinando sus electrones desapareados mediante un enlace covalente.

Las ROS se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular, pero

en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden incrementarse, rompiendo el equilibrio y dañando significativamente las estructuras celulares, provocando la situación conocida como *estrés oxidativo*. Su importancia radica no solo por su participación en la respiración aeróbica, sino también por sus implicaciones en procesos relevantes como el deterioro de alimentos, el envejecimiento celular y en patologías de enfermedades crónico-degenerativas.

Los radicales libres pueden dañar proteínas, lípidos y ADN. Es importante considerar que los RL son normales en nuestro organismo, donde hay mecanismos para contrarrestarlos y mantener un equilibrio. Sólo su exceso es nocivo, ya que puede producir un envejecimiento celular y global prematuro, dando lugar a diferentes enfermedades autoinmunes.

Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados por una gran variedad de antioxidantes: endógenos o propios del organismo (coenzima Q, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, ácido úrico, bilirrubina...), exógenos o adquiridos a través de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, flavonoides, escualeno, selenio, compuestos fenólicos...), enzimas antioxidantes (Superóxido-dismutasa, Catalasa, Glutatión-peroxidasa, Licopeno...), y cofactores antioxidantes (Cobre, Magnesio, Manganeso, Selenio...).

Las principales ROS se pueden clasificar en dos grupos:

- Especies radicálicas: como el anión superóxido (O<sup>1</sup><sub>2</sub>-), buen reductor y poco oxidante, hidroxilo (\*OH), poderoso oxidante en sistemas biológicos, hidroperoxilo (HO<sup>1</sup><sub>2</sub>), molécula bio-señalizadora en el crecimiento y desarrollo celular, alcoxilo (RO<sup>•</sup>), con capacidad oxidante media y peroxilo (RO<sup>1</sup><sub>2</sub>), con baja capacidad oxidante, pero alta difusibilidad.
- Especies no radicálicas: oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), altamente oxidante y muy reactivo, ozono (O<sub>3</sub>), un potente oxidante, y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), poco reactivo y precursor de otros RL.

La ROS con mayor reactividad es el radical hidroxilo, el cual procede de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, donde una molécula de peróxido de hidrógeno reacciona con una molécula de anión radical superóxido, u otro agente reductor, para producir 'OH, OH<sup>-</sup> y O<sub>2</sub>.

Un antioxidante es una sustancia que, presente en concentraciones bajas comparado con el sustrato oxidable, retrasa significativamente o evita la oxidación de éste. Los antioxidantes en la dieta humana protegen contra los radicales libres producidos por el estrés oxidativo.

El daño ocasionado por el estrés oxidativo depende principalmente de dos factores: la reactividad del radical libre que lo produce y la disponibilidad de un sustrato susceptible de ser atacado en las proximidades de la formación de dicho radical libre. Los mecanismos el estrés oxidativo consisten en la captación de un átomo de hidrógeno, o de un electrón, de una determinada molécula cercana (molécula diana) por parte del radical libre, estabilizándose el electrón desapareado del radical por formación de un par electrónico. De una u otra manera, se genera un nuevo radical que también tiene reactividad.

Los antioxidantes se pueden clasificar en función de su interacción con los sustratos oxidantes:

- <u>Primarios</u>: impiden la formación de radicales libres, en especial las ROS, reduciendo indirectamente el daño al ADN y a las membranas. Por ejemplo, vitamina E, polifenoles, como el resveratrol, o enzimas antioxidantes.

 <u>Secundarios</u>: interrumpen la propagación de radicales libres (α-tocoferol, ácido ascórbico) o desplazan las ROS (ácido ascórbico, carotenoides, glutatión, enzimas antioxidantes), inhibiendo la generación de ROS, e impidiendo la activación metabólica de carcinógenos.

- <u>Terciarios</u>: reparan el daño causado por los radicales libres o eliminan moléculas que se han estropeado, modificando el potencial redox y mejorando la reparación del ADN: vitamina C, polifenoles, selenio, N-acetilcisteína...

Los antioxidantes evitan la oxidación de las células por su capacidad para:

- Captar electrones desapareados. Tanto de las ROS como de las especies reactivas del nitrógeno.
- Secuestrar metales pesados, lo cual es de vital importancia ya que, aparte de evitar la oxidación de las células, protege de la toxicidad de determinados metales.
- Proteger el ADN como consecuencia de las acciones anteriores.

La producción y procesado de alimentos sólo es posible gracias a la utilización de aditivos, y las empresas se esfuerzan por utilizar ingredientes que, además de cumplir una función tecnológica, sean seguros para la salud y estén reglamentados por las autoridades alimentarias, ofreciendo productos de la mayor calidad posible a los consumidores. Existe una amplia variedad de aditivos que se añaden a los alimentos con objetivos tales como modificar o estabilizar sus características organolépticas (ej. colorantes), estabilizar determinadas características físicas (ej. emulgentes), prolongar su vida útil (ej. conservantes y antioxidantes) o mejorar sus componentes (ej. correctores de acidez). Entre los más utilizados en la industria alimentaria se encuentran los antioxidantes, lo que ha impulsado el estudio de su actividad antioxidante, así como de métodos de medida de su capacidad antioxidante [2].

La piel, el órgano más grande del cuerpo, se encuentra expuesta a las agresiones externas, responsables en gran parte de su envejecimiento, un proceso complejo en el cual intervienen factores genéticos, hormonales y ambientales. La cosmética intenta ponerle freno con agentes antioxidantes, esencialmente los mismos utilizados en alimentación, entre los que destacan:

- Vitamina C: Disminuye la fototoxicidad de los rayos UVA y UVB y neutraliza la mayoría de los radicales libres. Estimula la síntesis de colágeno y los procesos de regeneración.
- Vitamina E: Actúa como protector de la membrana celular frente a la oxidación de los lípidos y posee propiedades hidratantes y cicatrizantes.
- Polifenoles y Flavonoides: Se encuentran en muchas plantas. Protegen a las células gracias a su actividad antioxidante (función antienvejecimiento).
- Plantas que contengan antioxidantes: Existen numerosos aceites vegetales como el de higo chumbo que contienen altas dosis de vitaminas.

Los ingredientes naturales de origen vegetal se incorporan a los cosméticos tras extraerlos de los componentes activos. Los beneficios obtenidos de los antioxidantes externos a través de la alimentación o aplicados por vía tópica en la piel son múltiples: reparar moléculas dañadas (muy importante para moléculas como el ADN), bloquear la producción de radicales metálicos, estimular la producción de antioxidantes endógenos, incrementando las

defensas naturales, brindar un efecto protector, e impulsar la autodestrucción de las células cancerígenas.

La determinación de la capacidad antioxidante de compuestos puros resulta imprescindible para conocer la protección frente a la oxidación o el deterioro del alimento que lo alberga en su composición. Además de que estos antioxidantes se encuentran en diferentes proporciones, no se encuentra uno solo en cada alimento, sino que lo habitual es encontrar mezclas donde hay diferentes compuestos antioxidantes, cada uno con una capacidad diferente, lo que dificulta la tarea. La capacidad antioxidante se puede determinar mediante diferentes métodos algunos de los cuales se comentan a continuación.

#### Métodos HAT "Hydrogen Atom Transfer"

Miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. La reactividad depende de la energía de disociación del enlace del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. Estas reacciones son rápidas e independientes del pH y del disolvente, aunque son sensibles a la presencia de metales y agentes reductores, pudiendo provocar una mayor reactividad aparente del antioxidante.

### Métodos SET "Single Electron Transfer"

 Se da la transferencia de un electrón para reducir un compuesto dado. La reactividad de un antioxidante disminuye generalmente con el aumento del pH, reflejando un aumento en la capacidad electrodonadora con la desprotonación.

Entre los métodos de medida de capacidad antioxidante más usados se encuentran:

#### Medidas espectroscópicas

<u>FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).</u> Basado en la reducción del complejo de tripiridiltriazina con Fe(III) al complejo con Fe(II) por la acción de un antioxidante en medio ácido. Se mide el cambio absorbancia a 595 nm, proporcional a la actividad reductora de la muestra antioxidante. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-

cromán-2carboxílico) (µmol Trolox/g o µmol Trolox/L), análogo hidrosoluble de la vitamina E, tras la previa realización de una curva de calibrado.

<u>CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity</u>): Basado en la reducción de Cu(II) a Cu(I) por la acción combinada de los antioxidantes presentes en la muestra. La molécula neocuproína forma un complejo específico con el Cu(I), el cual absorbe a 450 nm. La medida de absorbancia de la muestra antioxidante analizada se convierte a equivalentes de Trolox.

<u>DPPH (1,1-Difenil-2-Picrilhidrazilo)</u>: La estabilización del radical transcurre principalmente a través de un mecanismo SET, con un ligero aporte de un mecanismo HAT. El DPPH<sup>•</sup> es una molécula sintética muy estable a consecuencia de la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, la cual provoca un color violáceo característico del radical, que en metanol absorbe a 515 nm. El color de la disolución en presencia de un antioxidante cambia a amarillento debido a la forma reducida del DPPH. La disminución de la absorbancia a 515 nm permite evaluar la capacidad antioxidante.

Una limitación de estos tres ensayos surge cuando las muestras o el producto de la reacción (o ambos) son coloreados, dando error por exceso o por defecto, dependiendo de las muestras. Otra limitación son las condiciones no fisiológicas utilizadas; para CUPRAC, el pH de trabajo es 5.5 y una gran cantidad de disolvente no acuoso (etanol); para DPPH el medio es totalmente no acuoso. El uso de un electrodo puede resolver estas limitaciones. El color de las muestras ahora será irrelevante, el pH podrá fijarse virtualmente a cualquier valor deseado, y se puede usar un medio acuoso de alta fuerza iónica. Además, las reacciones de la sonda antioxidante tienen lugar en la capa de difusión cerca de la superficie del electrodo, siendo mucho más rápidas que las mismas reacciones en la mayor parte de la disolución.

#### Medidas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas son en general más rápidas que a las técnicas espectroscópicas [3]. Los antioxidantes tienden a ser fácilmente oxidados sobre la superficie de un electrodo, y este hecho permite relacionar su comportamiento electroquímico con su actividad antioxidante [3, 4].

Se ha usado la voltametría cíclica sobre electrodos de carbón vitrificado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos puros con los potenciales de oxidación [4, 5, 6, 7]. Para ello, el antioxidante tiene que ser inactivo a los potenciales donde ocurre la reducción del oxígeno [8].

La oxidación del peróxido de hidrógeno sobre electrodos de mercurio se ha usado como fuente de ROS para determinar el carácter antioxidante en vinos, bebidas alcohólicas fuertes o cervezas [9-16]. El radical hidroperóxido formado reacciona en diferente extensión con los antioxidantes y esto permite proponer un parámetro para la medida de la reactividad de los diferentes antioxidantes basada en la disminución del área del pico de oxidación en voltametría de pulso diferencial [10, 17].

Esta metodología tiene el problema del uso de mercurio, restringido a laboratorios de investigación o altamente especializados, no siendo deseable la utilización en tareas de rutina en empresas del ámbito alimentario. Por ello, se planteó sustituir este electrodo por otros sin esta limitación.

Se han utilizado electrodos de carbón vitrificado modificados con polímeros conductores derivados de fenazinas y nanopartículas de platino [18,19] y plata [21, 22]. La interacción entre el antioxidante y los ROS generados en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se relaciona con la capacidad antioxidante de compuestos puros [23] y de extractos de alimentos [24].

El procedimiento es más sencillo, el tiempo de respuesta es menor y se evita el uso de electrodos de mercurio. Contrariamente a las medidas con electrodos de carbón, permite estudiar mezclas complejas, se pueden realizar ensayos a valores de pH cercanos al fisiológico, mientras que las medidas en mercurio tienen que hacerse a pH>10. Además, se pueden hacer en medios esencialmente acuosos y de alta fuerza iónica, como requieren las condiciones fisiológicas.

No obstante, cuando las muestras tienen que disolverse en alcoholes (etanol, metanol...) o acetona, como sucede en muchos extractos de alimentos o de plantas para cosmética, el polímero se deteriora tras unos pocos usos y hay que reponerlo con mucha frecuencia. Si el disolvente no acuoso está en

una proporción relativamente grande, el sensor se deteriora durante la propia medida y no puede utilizarse.

#### 1.1 Objetivo y esquema del trabajo

En este estudio se pretende desarrollar electrodos más simples y robustos que puedan ser aplicados a la determinación de la medida de la capacidad antioxidante global de mezclas y no solamente de compuestos puros. La hipótesis inicial es que los iones producidos en la oxidación del cobre pueden utilizarse para esta tarea, como sucede en los métodos CUPRAC y FRAP (en este caso con iones de hierro). Por tanto, se modificarán electrodos de carbón con cobre electrodepositado, el cual se utilizará para generar los iones cobre en las inmediaciones del electrodo. De esta forma el electrodo se modifica sin necesidad de utilizar un polímero, simplificando su manejo y el tiempo de elaboración.

Así pues, el objetivo de este trabajo es la preparación de electrodos basados en la electrodeposición de partículas metálicas catalíticas de cobre sobre carbón vitrificado, la caracterización superficial de estos electrodos, el estudio de su reproducibilidad y, por último, la investigación de su utilidad para la determinación de capacidad antioxidante.

# 2. Descripción de los materiales y procedimientos empleados.

#### 2.1 Instrumental

Para llevar a cabo las pesadas de las especies químicas sólidas empleadas se ha utilizado una balanza Sartorius, que proporciona una precisión de ±0.00001 g.

Las medidas de pH se han realizado en un pH-metro Crison GLP 21, con una precisión de ±0.01 unidades de pH, calibrado previamente con disoluciones tampón estandarizadas de pH 7 y pH 4

Por último, los estudios electroquímicos se han realizado con un sistema potenciostático de CH Instruments Inc., Electrochemical Workstation CHI650A.

# 2.2 Electrodos

Se han utilizado celdas electroquímicas de 50 mL de capacidad, componiéndose de entradas para los electrodos y corriente de nitrógeno. Los electrodos son:

- 1. Electrodos de trabajo:
  - Electrodos de carbón vitrificado (ECV) de CH Instruments Inc modelo CHI104, de 7.5 mm<sup>2</sup> de superficie.
- 2. Electrodo de referencia: Ag/AgCl/3M KCl de Metrohm 6.0733.100
- 3. Electrodo auxiliar: Pt de Metrohm 6.0301.100

# 2.3 Disoluciones y Reactivos

Las distintas disoluciones que se han utilizado, las cuales se prepararon usando agua purificada en un sistema Milli-Q, son las siguientes:

- o Disolución de HNO3 0.5M
- Disolución de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1 mM
- Disolución tampón H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.25M para pH 7, donde el pH se ajustó con NaOH sólido.
- o Mezcla crómica diluida en proporción 1:5
- o Agua regia: (HCl y HNO<sub>3</sub>) concentrados en una proporción de 3:1

Para la evaluación de los electrodos con relación a la actividad antioxidante, los reactivos que se han utilizado son los siguientes (a la concentración de 2 mM para cada uno de ellos):



но он



Ácido Ascórbico

Ácido Gálico

Trolox

#### 2.4 <u>Condiciones de Trabajo</u>

Previamente a la electrodeposición de cobre se realizó una limpieza profunda del electrodo de trabajo por pulido mecánico. En primer lugar, para una limpieza más exhaustiva, se sumerge el electrodo en una disolución de mezcla crómica diluida durante 1 minuto, una vez retirado, el residuo se elimina con agua destilada para posteriormente introducir el electrodo en una disolución de agua regia, llevando a cabo el mismo procedimiento que en el caso anterior. Esto es imprescindible porque las pruebas realizadas indican que las nanopartículas de cobre se incrustan en las primeras capas del carbón vitrificado y es necesario eliminarlas de éstas para una buena reproducibilidad.

A continuación se pule con pasta de diamante (0.25 micras) en un paño de pulido; seguidamente, se pule con alúmina de 0.3  $\mu$ m (alúmina A) y finalmente, se emplea alúmina de 0.05  $\mu$ m (alúmina B). Entre cada pulido se lava el electrodo con agua Milli-Q.

Una vez terminada la limpieza del electrodo, se realiza un acondicionamiento electroquímico del electrodo en buffer H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 realizando 4-10 ciclos en voltametría cíclica de barrido lineal de potencial a  $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , entre -0.35 V y 0.4 V garantizando que el electrodo está limpio, al tiempo que se reorganiza la superficie electródica de manera que la respuesta sea estable y reproducible.

Posteriormente, para la electrodeposición de las partículas de cobre se emplean disoluciones de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1 mM en HNO<sub>3</sub> 0.5 M, después de haber pasado una corriente de nitrógeno durante 10 minutos aproximadamente.

## 3. Resultados obtenidos y discusión

#### 3.1. Optimización de las condiciones de trabajo

En primer lugar se abordó la búsqueda de las condiciones óptimas de trabajo. Para ello, se ha llevado a cabo la limpieza del electrodo mediante pulido mecánico, como se ha descrito en la sección anterior, utilizando pasta de diamante seguida de las alúminas A y B, y entre pulido y pulido limpiando con agua destilada. A continuación, se ha realizado una limpieza electroquímica en HNO<sub>3</sub> 0.5M en la que se ha llevado a cabo voltagramas cíclicos (5 barridos) entre 1 V y –0.8 V, a una velocidad de barrido de 0.08 V·s<sup>-1</sup>. La experiencia se ha realizado en dos ocasiones, llevando a cabo el mismo procedimiento en el cual se observa una pequeña señal localizada a –0.04V pudiendo ser resultado de un residuo adherido a la superficie del electrodo, como se observa en la figura 1A.

Debido a esto, se vuelve a realizar una limpieza donde en este caso solo se recurre a los dos tipos de alúmina. Cada experiencia realizada corresponde a una limpieza electroquímica del electrodo, observándose que, aunque se han variado las condiciones de limpieza, a –0.04V sigue apareciendo la señal no deseada (figura 1B).

Cuando se realizó la misma de limpieza y el acondicionamiento electroquímico en NaCl 0.5 M, los resultados fueron muy similares, y la señal indeseada no se eliminó.

Finalmente se optó por limpiar a fondo el electrodo como se ha descrito en la sección anterior, con lo que los voltagramas no mostraron ningún tipo de pico indeseado.

Para estudiar las mejores condiciones para la electrodeposición de las partículas de cobre, se utilizaron disoluciones de  $Cu(NO_3)_2$  1mM en HNO<sub>3</sub> 0.5M. Las medidas se realizan por voltametría cíclica entre 0.4 V y -0.5 V, a una velocidad de barrido de 0.1 V·s<sup>-1</sup>.





Se ha limpiado el electrodo sumergiéndolo durante seis minutos en ácido nítrico concentrado (al 60%), seguido de la limpieza con pulido mecánico, usando en primer lugar pasta de diamante y posteriormente utilizar las dos alúminas (entre pulido y pulido se limpia con agua destilada). Una vez realizado esto, se hace un acondicionamiento electroquímico en NaCl 0.5 M, obteniéndose las medidas 1 y 2 de la figura 2.

A continuación, se ha sumergido el electrodo durante un minuto en ácido nítrico concentrado al 60% seguido de la limpieza con las dos alúminas. Posteriormente se ha realizado el acondicionamiento electroquímico en NaCl 0.5M (medidas 3 y 4 de la figura 2).



Figura 2. Voltagramas cíclicos sobre ECV de  $HNO_3 0.5 \text{ M} \text{ a } 0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ , (limpieza con  $HNO_3$  concentrado). La flecha indica el inicio del barrido.

Se observa que la intensidad del pico de oxidación crece conforme se van realizando las distintas medidas, lo que se puede explicar si el cobre que se va depositando en el electrodo después de las medidas voltamétricas no se elimina del todo con la limpieza.

A continuación, el electrodo se ha tratado con mezcla crómica diluida durante 2 minutos, seguido de la limpieza con las dos alúminas y de un acondicionamiento electroquímico en NaCl, obteniéndose las medidas 1 y 2 de la figura 3. A continuación, se ha repetido el mismo procedimiento. Obteniéndose las medidas 3 y 4.

Se observa que la intensidad ha variado poco a medida que se han ido realizando las repeticiones, obteniéndose una mayor reproducibilidad en mezcla crómica diluida que con ácido nítrico concentrado.



Figura 3. Voltagramas cíclicos sobre ECV de  $HNO_3 0.5 M a 0.1 V \cdot s^{-1}$ , usando mezcla crómica diluida como limpieza. La flecha indica el inicio del barrido.

Una vez observado que haciendo uso de mezcla crómica diluida en la limpieza del electrodo se obtienen buenos resultados, se llevará a cabo dicha limpieza bajo distintas condiciones para obtener la mejor reproducibilidad.

Se limpia el electrodo con pasta de diamante y se introduce tres minutos en mezcla crómica diluida, para después hacer uso de las dos alúminas. Tras esta limpieza, se realiza el acondicionamiento electroquímico en NaCI 0.5 M registrando voltagramas cíclicos entre 1 V y –0.8 V a 0.08 V·s<sup>-1</sup> tras 5 minutos de corriente de N<sub>2</sub>. A continuación se lleva a cabo la electrodeposición de cobre sobre cinco electrodos diferentes, a distintos tiempos de electrodeposición para cada uno de ellos (15, 30, 60 segundos), a –0.075V y a una concentración de cobre de 1 mM. Los electrodos se sacaron de la disolución en la que se realizó la electrodeposición, se enjuagaron con un chorro suave de agua destilada y se introdujeron en una disolución tampón PBS a pH 7.0, realizando 5 barridos cíclicos entre 1 V y -0.8 V a una velocidad de barrido de 0.08V·s<sup>-1</sup>. Algunos de los resultados se muestran en la figura 4. Cuando el tiempo de deposición es de 15 segundos, no se aprecia la presencia de cobre en la superficie del electrodo, mientras que al aumentar el tiempo de deposición se observa en el voltagrama la señal de oxidación del cobre depositado en la superficie del ECV,

y la de reducción de los iones Cu(II) generados, en el barrido de vuelta. Ambas señales aumentan con el tiempo de deposición.



Figura 4. Voltagramas cíclicos sobre ECV de disolución tampón PBS a pH 7 a 0.08  $V \cdot s^{-1}$  tras la electrodeposición, a distintos tiempos. La flecha indica el inicio del barrido.

Se trata ahora de ver si estas señales son reproducibles. Se han limpiado los electrodos con pasta de diamante y se han sumergido durante 3 minutos en mezcla crómica diluida, seguido de la limpieza con las dos alúminas. El acondicionamiento se realiza en NaCl 0.5 M pasando 10 minutos una corriente de N<sub>2</sub>, y se realiza la deposición para cada uno de ellos usando una disolución 1 mM de Cu en HNO<sub>3</sub> 0.5 M. Los tiempos de deposición son de 15, 30, 60, 90s usando un potencial de -0.1V. En la figura 5 se muestran los cronoamperogramas correspondientes a estas electrodeposiciones.



Figura 5. Cronoamperogramas sobre ECV de  $HNO_3 0.5 \text{ M y 1} \text{ mM Cu}(NO_3)_2 \text{ a } -0.1 \text{ V}$ , a distintos tiempos.

Los electrodos se sacaron de la disolución en la que se realizó la electrodeposición, se enjuagaron con un chorro suave de agua destilada y se introdujeron en una disolución de tampón PBS a pH 7.0, realizando un barrido cíclico entre –0.35 V y 0.4 V a una velocidad de barrido de 0.1 V·s<sup>-1</sup>. Algunos de los resultados se muestran en la figura 6 en la que se observa cómo la intensidad va aumentando conforme aumenta el tiempo de deposición, aunque no de forma lineal.

El electrodo se dejó durante un día sumergido en mezcla crómica diluida y se realizó la limpieza como en los casos anteriores. El acondicionamiento se realizó en disolución tampón PBS a pH 7 con 10 ciclos entre -0.35 V y 0.4 V a una velocidad de barrido de 0.25 V·s<sup>-1</sup> y se llevó a cabo la electrodeposición durante 60 segundos al potencial de -0.3V. Los resultados para barridos sucesivos en PBS sin limpiezas intermedias se muestran en la figura 7.



Figura 6. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7 a 0.1  $V \cdot s^{-1}$  tras electrodeposición, a distintos tiempos. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 7. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7 a 0.25  $V \cdot s^{-1}$ . La flecha indica el inicio del barrido.

Parece que la reproducibilidad es buena. Para asegurar esto se realizaron voltagramas de pulso diferencial entre los potenciales de –0.3 V y 0.2 V, con una amplitud de pulso de 0.05 V, realizando entre cada medida una limpieza del electrodo con agua destilada, ya que esta técnica es más sensible a las pequeñas diferencias que la voltametría de barrido lineal. Los resultados se

muestran en la figura 8. Como puede verse, aunque los registros son muy parecidos, no hay una reproducibilidad total.



Figura 8. Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 9. Voltagramas de onda cuadrada sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.

Para monitorizar la reproducibilidad se ha utilizado también la voltametría de onda cuadrada, en las mismas condiciones descritas para la voltametría de

pulso diferencial, entre los potenciales –0.3 V y 0.3 V, una amplitud de 0.02 V, y una frecuencia de 25 Hz, realizando entre cada medida la limpieza del electrodo con agua destilada, y los resultados se muestran en la figura 9. La señal no llega a ser totalmente reproducible tampoco en este caso.

En un nuevo experimento se ha electrodepositado el cobre a 30 y 45 segundos a un potencial de -0.3 V y se han realizado medidas con el electrodo en PBS a pH 7, a un potencial inicial inicial y final de -0.35 V y 0.4 V a una velocidad de barrido de 0.1 V·s<sup>-1</sup> sin realizar la limpieza del electrodo entre las medidas, como se observa en la figura 10.



Figura 10. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7 a 0.1  $V \cdot s^{-1}$  tras electrodeposición a distintos tiempos. La flecha indica el inicio del barrido.

Puede verse que las señales de oxidación son muy parecidas a ambos tiempos, lo que parece indicar que el área efectiva del cobre metálico depositado en el ECV es muy parecida en ambos casos. Esto debería estar relacionado con la morfología del depósito de cobre. Además, la señal de oxidación es muy reproducible mientras que las señales del barrido de vuelta (reducción) no lo son tanto.

Los voltagramas de pulso diferencial no muestran la misma reproducibilidad para la señal de oxidación, como se ve en la figura 11 la señal cada vez disminuye más al realizar medidas sucesivas sin limpiezas intermedias, aunque en el caso de 45 segundos parece que la intensidad tiende a estabilizarse tras varias un número elevado de medidas.

Cuando se realizan barridos sucesivos sobre el mismo electrodo en voltametría de pulso diferencial, la intensidad va disminuyendo hasta que se estabiliza, como se puede ver en la figura 12. Esto puede deberse a que el depósito de cobre en la superficie del carbón se va reorganizando en los sucesivos barridos, de manera que a partir de un número de barridos determinado la superficie del cobre metálico no cambia en tamaño ni morfología.



Figura 11. Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV, tras la electrodeposición de 30 segundos (izquierda) y 45 segundos (derecha), en disolución tampón PBS a pH 7.



Figura 12. Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.

Los resultados sugieren que para obtener depósitos de cobre reproducibles completamente hay que realizar un tratamiento al electrodo mediante barridos sucesivos en voltametría de pulso diferencial de manera que tenga lugar la reorganización de la superficie.

Lo siguiente es establecer cuál va a ser el tiempo óptimo de deposición. Se necesita un electrodo con la mayor superficie específica posible. Para ello no es deseable que se forme una película de cobre de un grosor determinado sobre la superficie del carbón, ya que esto equivale a utilizar un electrodo de cobre y no sería necesaria la electrodeposición. Una aglomeración de partículas sobre el electrodo debe presentar mayor superficie específica que una capa de cobre, así que cabe esperar que la intensidad del pico de oxidación aumente con el tiempo de deposición, ya que aumenta el número y tamaño de partículas de cobre que se encuentran sobre el electrodo, y luego la intensidad se estabilice o disminuya.

Se ha limpiado el electrodo durante 1 minuto con mezcla crómica diluida, y posteriormente con pasta de diamante, alúmina A y alúmina B. En la figura 13 se muestran los resultados después de la deposición de cobre a distintos tiempos a un potencial de –0.3V. En la figura se presentan los voltagramas cíclicos de barrido lineal de potencial y los voltagramas de pulso diferencial obtenidos después de varios barridos, tras los cuales la señal ya no cambiaba.

Puede verse que a medida que se depositan las partículas sobre el electrodo de carbón la señal de oxidación crece, porque el área de cobre metálico se incrementa. A partir de un tiempo de deposición el incremento de la señal es cada vez menor con respecto al que cabría esperar porque el recubrimiento de la superficie del ECV se hace cada vez mayor. A partir de un tiempo de 90-100 s la intensidad de la señal disminuye, debido a que las partículas se van aglomerando y el área expuesta de cobre metálico disminuye en consecuencia. En este trabajo se ha elegido depositar a 60 s para trabajar con una señal lo más alta posible, lo que dará lugar a una mayor sensibilidad, que además mantiene una morfología de partículas de cobre en la superficie del ECV lo que debería incrementar las propiedades catalíticas del electrodo.



Figura 13. A) Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, tras electrodeposición a distintos tiempos. B) Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, tras electrodeposición a distintos tiempos. C) Intensidades de pico frente al tiempo de deposición. Las flechas indican el inicio de los barridos.

A continuación, se ha estudiado la reproducibilidad de las señales en estas condiciones (potencial de electrodeposición –0.3 V, tiempo de deposición 60 s), limpiando con mezcla crómica diluida, pasta de diamante y las dos alúminas.

Después de la limpieza se han realizado dos series de acondicionamientos diferentes en disolución tampón PBS a pH 7. En el caso A se lleva a cabo el acondicionamiento por voltametría cíclica a un potencial inicial y final de –0.35 V y 0.3 V, con 15 ciclos a 0.25 V·s<sup>-1</sup> y en el caso B con 10 ciclos a 0.05 V·s<sup>-1</sup>. Este experimento se realizó dos veces de forma independiente. Los resultados se muestran en la figura 14, en la que puede verse la buena reproducibilidad en ambos casos.

En el barrido de oxidación la reproducibilidad es muy buena en ambos casos, y hay pequeñas diferencias en el barrido de reducción. No obstante, se realizaron medidas con voltametría de pulso diferencial para establecer con más precisión la reproducibilidad. Esto se muestra en la figura 15, donde se presentan solamente los resultados del acondicionamiento A. Las series de medidas se han realizado sin limpiar entre medidas, y puede verse que la intensidad disminuye para cada serie de medidas.



Figura 14. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. A) 15 ciclos a  $0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  B) 10 ciclos a  $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ . La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 15. Acondicionamiento mediante voltametría de pulso diferencial sobre ECV en tampón PBS a pH 7 correspondiente al experimento A) 15 ciclos a 0.25 V·s<sup>-1</sup>. La flecha indica el inicio del barrido.

Para intentar que los resultados sean reproducibles, se ha realizado la limpieza con mezcla crómica diluida durante dos minutos y luego procediendo a limpiar con pasta de diamante y alúmina B. La deposición llevada a cabo durante 60 a -0.3 V segundos es la recogida en la figura 16.



Figura 15. Cronoamperograma sobre ECV en  $HNO_3 0.5 \text{ M} \text{ y} 1 \text{ mM } Cu(NO_3)_2 \text{ a} -0.3 \text{ V}$ , con 60 segundos de electrodeposición.

El acondicionamiento se realiza con 15 ciclos a  $0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  seguidos por 10 ciclos a  $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ . De esta forma, los voltagramas de pulso diferencial obtenidos en dos barridos sucesivos, limpiando con un chorro suave de agua destilada entre las medidas, son reproducibles (figura 16).



Figura 16. Acondicionamiento de 15 ciclos a  $0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  seguidos por 10 ciclos a  $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  mediante voltametría de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.

Con esto se consigue una reproducibilidad muy buena de las medidas en voltametría de pulso diferencial para la señal de oxidación. A continuación, se intentará optimizar también la señal de reducción.

Las siguientes medidas se han realizado cambiando el electrodo de carbón por otro nuevo y depositando el cobre en las mismas condiciones descritas. Se registraron 2 ciclos voltamétricos seguidos, sin limpieza entre ellos (figura 17). La señal de reducción obtenida es bastante reproducible. Sin embargo, en estas condiciones los resultados obtenidos en DPV no son completamente reproducibles (figura 18).



Figura 17. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 18. Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.

En definitiva, con las estrategias de limpieza y acondicionamiento que se han empleado hasta ahora, no es posible obtener una completa reproducibilidad de las señales de oxidación y reducción al mismo tiempo. Esto tiene que estar relacionado con la morfología del depósito de cobre sobre el electrodo de carbón. El tratamiento con mezcla crómica diluida permite eliminar cualquier resto de materia orgánica que pueda haber en la superficie del electrodo y también oxidar los restos de cobre. No obstante, como se comentó anteriormente, es posible que el cobre se incruste en las primeras capas del carbón y la mezcla crómica diluida no pueda acceder a todo el cobre depositado. Se ha optado por probar a eliminar el cobre con agua regia, ya que la presencia de los cloruros capaces de complejar el cobre es extremadamente eficiente para su eliminación [25], y estos iones tienen menor tamaño y mayor difusibilidad que los iones dicromato.

Para llevar a cabo los experimentos de reproducibilidad para los tratamientos con agua regia, se ha utilizado un electrodo de carbón vitrificado completamente nuevo, que se limpió solamente con alúmina B y se acondicionó en HNO<sub>3</sub> 0.5 M, con 5 ciclos voltamétricos entre –0.3 V y +0.5 V a 0.05 V·s<sup>-1</sup>. A continuación se llevó a cabo la electrodeposición durante 60 segundos a un potencial de –0.3 V en el mismo medio y se registró el voltagrama cíclico en PBS a pH 7, obteniendo resultados similares a los anteriores (figura 19).





Se realizaron diferentes pruebas de limpieza con agua regia, mezcla crómica diluida y combinando ambas limpiezas. Finalmente, se llegó al protocolo de limpieza siguiente: se limpia el electrodo con pasta de diamante, seguida de las alúminas A y B, se deja sumergido en mezcla crómica diluida durante 20 s y después en agua regia durante otros 30 s. La deposición se lleva a cabo durante 60s a -0.3 V en HNO<sub>3</sub> 0.5 M.

Las medidas realizadas en voltametría de pulso diferencial limpiando solamente con agua entre medida y medida presentaron muy buena reproducibilidad, como se observa en las figuras 20 y 21.



Figura 20. Voltagramas de pulso diferencial sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 21. Intensidades de pico normalizadas al mayor valor para los registros sucesivos mostrados en la figura 20.

Las intensidades de los registros sucesivos, con la simple limpieza con agua, se mantienen en valores que difieren en menos del 1% del valor promedio (indicado en la figura 21 con la línea horizontal), durante 11 registros. Esto quiere decir que la superficie del recubrimiento de cobre no se altera significativamente, y el electrodo es reproducible para la señal de oxidación, al menos durante 10 medidas, con un 1% de incertidumbre. Además, la señal de reducción es también reproducible con los barridos sucesivos



Figura 22. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, para registros equivalentes a los de la figura 20. La flecha indica el inicio del barrido.

#### 3.2. Ensayos con antioxidantes

El objetivo último de este trabajo es la preparación de electrodos basados en la electrodeposición de partículas metálicas catalíticas de cobre sobre carbón vitrificado para aplicarlos a la determinación de capacidad antioxidante. Para establecer si esto es posible, se han utilizado tres antioxidantes muy conocidos:

 Ácido ascórbico, que es desde hace décadas el antioxidante más conocido en el planeta. Su isómero L es la vitamina C y por su disponibilidad, bajo precio y biocompatibilidad es el aditivo antioxidante más utilizado en alimentación (E300). – Ácido gálico, un compuesto trifenólico de bajo peso molecular que se produce de forma natural, y se ha revelado como un fuerte antioxidante, sobre 1.6 veces más potente que el ácido ascórbico.

– Trolox, un antioxidante soluble en agua análogo de la vitamina E. Debido a las dificultades para medir los componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja, la equivalencia en trolox se utiliza como referencia para la capacidad antioxidante de mezclas.

En primer lugar, se han llevado a cabo estudios con el ácido gálico. Se limpió el electrodo, sumergiéndolo durante 30 segundos en mezcla crómica diluida, seguido de 30 segundos de agua regia, quitando el exceso de residuo con agua destilada. Posteriormente se realiza la limpieza como se ha descrito en procesos anteriores, con pasta de diamante, y las dos alúminas.

La electrodeposición de cobre se ha llevado a cabo a –0.3V durante 60 segundos en HNO<sub>3</sub> 0.5M y 1mM Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Posteriormente se ha llevado a cabo un acondicionamiento mediante voltametría de pulso diferencial en disolución PBS 0.25M, a pH 7.

Se registraron los voltagramas cíclicos en disolución tampón PBS a pH 7, a una velocidad de barrido de 0.25 V·s<sup>-1</sup>, añadiendo diferentes cantidades de ácido gálico de concentración 5·10<sup>-5</sup> M a 50 mL de tampón. Ente dos medidas se ha pasado una corriente de nitrógeno durante 30 s. En la figura 23 se muestran los resultados.



Figura 23. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, para 50 mL de tampón PBS a pH 7, a  $0.25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , añadiendo diferentes cantidades de ácido gálico de concentración  $5\cdot10^{-5}$  M. La flecha indica el inicio del barrido.

Como se puede observar, la señal de reducción disminuye apreciablemente conforme aumenta la concentración de ácido gálico. Como se vio en la introducción, el ensayo CUPRAC para la medida de capacidad antioxidante, se basa en el efecto de los antioxidantes sobre la reducción de Cu(II) a Cu(I). En este caso, la señal de reducción se debe al paso de Cu(II) a Cu(0), pero la interpretación es la misma. En el barrido de oxidación se originan iones Cu(II) los cuales se reducen en el barrido de reducción. El antioxidante interacciona con los iones Cu(II) retirándolos del medio y disminuyendo así la señal de reducción. La tasa de disminución está relacionada con la capacidad antioxidante.

En la figura 24 se ha representado el porcentaje de disminución de la señal de reducción (medido como intensidad de pico) frente a la concentración de ácido gálico añadida. Se recogen dos tandas de experimentos, una realizada como se ha descrito para la figura 23 (añadiendo ácido gálico de concentración 5·10<sup>-5</sup> M a 50 mL de tampón) y una segunda tanda añadiendo ácido gálico de concentración 2.5·10<sup>-5</sup> M a 40 mL de tampón. Como puede verse, los resultados obtenidos fueron muy similares.



Figura 24. Porcentaje de disminución de la señal de reducción de los voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, a  $0.25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , añadiendo diferentes cantidades de ácido gálico de concentración  $5 \cdot 10^{-5}$  M a 50 mL de tampón (cuadrados negros) o concentración  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M a 40 mL de tampón (círculos rojos).

En el caso del ácido ascórbico se ha operado de la misma forma y los resultados obtenidos se recogen en la figura 25. Como puede verse, la presencia de ácido ascórbico disminuye la intensidad del pico de reducción.

Finalmente, en el caso del trolox también se ha operado de la misma forma y los resultados obtenidos inicialmente se recogen en la figura 26. Como puede verse, la presencia de trolox disminuye la intensidad del pico de reducción, pero a potenciales más positivos que la señal del cobre aparece un par redox, debido a la oxidación del trolox y la posterior reducción de este antioxidante en el barrido de vuelta. Con objeto de investigar si los procesos que ocurren a los potenciales a los que aparece esta señal interfieren con el procedimiento de medida de capacidad antioxidante, se han registrado en un nuevo experimento los voltagramas con una amplitud de barrido menor, evitando en los posible la aparición de los picos correspondientes al trolox. Esto se recoge en la figura 27.



Figura 25. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, para 50 mL de tampón PBS a pH 7, a  $0.25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , añadiendo diferentes cantidades de ácido ascórbico de concentración  $5\cdot10^{-5}$  M. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 26. Voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, para 50 mL de tampón PBS a pH 7, a  $0.25 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ , añadiendo diferentes cantidades de trolox de concentración  $5 \cdot 10^{-5}$  M. La flecha indica el inicio del barrido.



Figura 27. Voltagramas cíclicos sobre ECV en las mismas condiciones de la figura 26, a menor amplitud de barrido. La flecha indica el inicio del barrido.

En la figura 28 se comparan los porcentajes de disminución de la señal de reducción para el ácido gálico, el ácido ascórbico y el trolox.



Figura 28. Porcentaje de disminución de la señal de reducción de los voltagramas cíclicos sobre ECV en disolución tampón PBS a pH 7, a  $0.25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , añadiendo diferentes cantidades de antioxidantes de concentración  $5\cdot10^{-5}$  M a 50 mL de tampón.

En las mismas condiciones de pH, electrodo y concentración de antioxidante añadido, la disminución de la señal de reducción está directamente relacionada con la capacidad antioxidante [9, 11, 17-24]. Como se dijo en la introducción, las capacidades antioxidantes se suelen referir a trolox; esto es fácil de hacer, dividiendo el porcentaje de disminución para un antioxidante a una concentración entre el correspondiente al trolox, a la misma concentración. Así, de los valores correspondientes a la figura 28 se tiene que, por encima del 10% de disminución [9, 11, 17-24] las capacidades antioxidantes, en moles de trolox, del ácido gálico y del ácido ascórbico son 1.30 y 0.79, esto es, la relación entre las capacidades antioxidantes del ácido gálico y del ácido ascórbico es 1.65, en buen acuerdo con el obtenido por CUPRAC para estos dos antioxidantes, de 1.72 [23]. Es decir, los electrodos de carbón vitrificado recubiertos con partículas de cobre conducen a la misma relación de capacidad antioxidante que el método de CUPRAC, para estos compuestos.

#### 3.3 Caracterización con microscopía electrónica de barrido

El principio del SEM se fundamenta en incidir sobre la muestra un haz de electrones, generado por el filamento, finamente enfocado emitiendo una señal que se registra en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos. Gracias a los detectores, se recogen los electrones que han sido generados por la interacción con la superficie creando una imagen que refleja que las características superficiales de la misma, proporcionando así, información sobre forma, textura y composición química. [26]

Cuando el haz electrónico "barre" línea por línea, una pequeña área de la superficie (aumentos), emite electrones, lo cuales son recogidos por los detectores.

Con objeto de caracterizar la electrodeposición del cobre sobre el electrodo, se han utilizado discos de carbón vitrificado de  $23.7 \pm 0.5 \text{ mm}^2$  de superficie con un grosor de 10 mm. Estos discos se han introducido cuidadosamente en la disolución mediante unas pinzas de cocodrilo y se ha procedido a la electrodeposición en HNO<sub>3</sub> 0.5 M a –0.3 V y durante 30, 60 y 90 s, con objeto

de evaluar el recubrimiento de la superficie. Además, al tiempo de medida que se seleccionó para el trabajo, 60 s, se ha realizado un barrido de voltametría de pulso diferencial para reacondicionar la superficie del electrodo y evaluar qué le sucede a dicha superficie.



Figura 29. Imágenes de energía dispersiva de rayos X de los electrodos tras las electrodeposiciones a 30 s (izquierda) y 60 s (derecha). Voltaje de aceleración 5.0 kV. Distancia de trabajo 18 mm.

En la figura 29 se presentan los resultados de las medidas de energía dispersiva de rayos X (EDS) correspondientes a los experimentos realizados a 30 y 60 s, donde se puede apreciar que el electrodo se recubre de cobre de forma gradual. A 30 s se observan partículas aisladas de cobre muy diseminadas sobre el electrodo, mientras que a 60 s el recubrimiento del electrodo es mayor. Esto se aprecia mejor en las imágenes siguientes.

En la figura 30 se presentan los SEM correspondientes a los experimentos realizados a 30 s. En la imagen de la izquierda se aprecia la distribución de las partículas de cobre sobre el carbón. En la imagen de la derecha se puede ver que las partículas de cobre tienen tamaños entre 120 nm y 450 nm, con un tamaño promedio de unos 310 nm (aunque también hay algunas partículas mucho más pequeñas, de menos de 50 nm), y que no forman grandes agregados.



Figura 30. Imágenes SEM del ECV después de 30 segundos de deposición en  $HNO_3$ 0.5 M a -0.3 V. Voltaje de aceleración 5.0 kV. Distancia de trabajo 18 mm.

Los SEM correspondientes a los experimentos realizados a 60 s se recogen en la figura 31. En la imagen de la izquierda se aprecia que las partículas de cobre recubren en mayor medida la superficie del electrodo y los aglomerados tienen tamaños entre 0.8 µm y 11 µm, con un tamaño promedio de unos 5 µm, aunque también hay algunas partículas mucho más pequeñas diseminadas, de menos de 500 nm. En la imagen de la derecha se aprecia la morfología de uno de los agregados, que están constituidos por acumulaciones de partículas de cobre de entre 100 nm y 700 nm de tamaño.

En la figura 32, los resultados a 90 s de deposición muestran un recubrimiento del electrodo mucho mayor, con aglomerados de mucho mayor tamaño (entre 3.5 µm y 27 µm) y algunas partículas más pequeñas entre aglomerados de unos 200 nm. Este mayor tamaño de aglomerados conduce a una menor superficie específica, lo que provoca que la intensidad observada en los voltagramas de pulso diferencial sea menor que la esperada de la extrapolación a menores tiempos de deposición (véase la figura 13).



Figura 31. Imágenes SEM del ECV después de 60 segundos de deposición en  $HNO_3$  0.5 M a -0.3 V. Voltaje de aceleración 5.0 kV. Distancia de trabajo 18 mm.



Figura 32. Imágenes SEM del ECV después de 90 segundos de deposición en  $HNO_3$  0.5 M a -0.3 V. Voltaje de aceleración 5.0 kV. Distancia de trabajo 18 mm.

Después de una deposición a 60 s, se ha realizado un barrido de voltametría cíclica para reacondicionar la superficie del electrodo. Como se vio anteriormente y se ilustra en las figuras 20 y 22, tras un acondicionamiento del electrodo consistente en realizar un voltagrama de pulso diferencial, la respuesta del electrodo se mantiene constante, o casi constante, durante 10 barridos sucesivos o más. Los SEM correspondientes a este experimento se recogen en la figura 33. En la imagen de la izquierda se aprecia que los aglomerados de partículas de cobre que recubren la superficie del electrodo se distribuyen de manera similar a la encontrada antes del barrido (figura 31

izquierda) y sus tamaños son entre 1.8 μm y 11 μm, muy parecidos a los que se observaron antes del barrido. Sin embargo, en la imagen de la derecha se aprecia que los agregados, que siguen estando constituidos por acumulaciones de partículas de entre 100 nm y 800 nm de tamaño (algunas algo mayores), son muy diferentes de los encontrados antes del barrido, con formas más globulares. En principio, esta distribución de las partículas debería mantenerse después de varios barridos. Esto no se ha establecido aun experimentalmente y deberá ser objeto de un futuro estudio.



Figura 33. Imágenes SEM del ECV después de 60 segundos de deposición en  $HNO_3$ 0.5 M a -0.3 V, seguidos de un barrido realizando voltametría cíclica. Voltaje de aceleración 5.0 kV. Distancia de trabajo 18 mm.

# 4. Conclusiones

 Las condiciones óptimas para la limpieza del electrodo de carbón vitrificado (ECV) para la mejor reproducibilidad con el uso de mezcla crómica diluida, agua regia, pasta de diamante y dos tipos de alúminas.

Las condiciones óptimas para la electrodeposición de cobre son: potencial de deposición = -0.3V, tiempo de deposición = 60 segundos a partir de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
1 mM, en medio HNO<sub>3</sub> 0.5M.

- Las condiciones óptimas para el acondicionamiento del depósito de cobre consisten en realizar un voltagrama de pulso diferencial en disolución PBS (buffer fosfato) 0.25 M, a pH 7 entre –0.3 V y 0.2 V. En estas condiciones Las señales de oxidación y reducción para barridos sucesivos, son reproducibles al menos durante 10 medidas, con un 1% de incertidumbre.

– La presencia de un antioxidante provoca la disminución de la señal de reducción debido a la interacción con los iones Cu(II) generados en el barrido de oxidación. Esta disminución de la señal cual está relacionada directamente con la capacidad antioxidante.

– Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido (SEM) indican que, a medida que el tiempo de electrodeposición aumenta, las partículas de cobre van recubriendo en mayor medida la superficie del electrodo, formando además aglomerados de mayor tamaño. El acondicionamiento del electrodo no modifica sustancialmente el tamaño y distribución de los aglomerados de partículas de cobre, pero estos son muy diferentes de los encontrados antes del barrido, con formas más globulares

– Con el uso de estos electrodos de cobre depositado sobre ECV se han medido las capacidades antioxidantes (CAO) de ácido ascórbico y ácido gálico en equivalentes de trolox en condiciones cercanas a las condiciones fisiológicas. Estas CAO están en la misma relación que las obtenidas por el método CUPRAC, lo que indica que los electrodos propuestos son útiles para la determinación de capacidad antioxidante.

# 4b. Conclusions

– The optimal conditions for the cleaning of the glassy carbon electrode (GCE) for the best reproducibility with the use of diluted chromic mixture, aqua regia, diamond paste and alumina of two types.

– The optimal conditions for copper electrodeposition are: deposition potential = -0.3V, deposition time = 60 seconds from Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1mM, in 0.5M HNO<sub>3</sub> medium.

– The optimal conditions for the conditioning of the copper deposit consist of performing a differential pulse voltammogram in PBS solution (phosphate buffer) 0.25 M, at pH 7 between –0.3 V and 0.2 V. Under these conditions, the oxidation and reduction signals for successive scans are reproducible for at least 10 measurements, with 1% uncertainty.

– The presence of an antioxidant causes the reduction of the reduction signal due to the interaction with the Cu (II) ions generated in the oxidation scan. This decrease in the signal is directly related to the antioxidant capacity.

- The results obtained by scanning electron microscopy (SEM) indicate that, as the electrodeposition time increases, the copper particles coat the electrode surface to a greater extent, forming larger agglomerates as well. The conditioning of the electrode does not substantially modify the size and distribution of the agglomerates of copper particles, but these are very different from those found before the scan, with more globular shapes

- With the use of these copper electrodes deposited on ECV, the antioxidant capacities (CAO) of ascorbic acid and gallic acid in trolox equivalents have been measured in conditions close to physiological conditions. These CAOs are in the same relationship as those obtained by the CUPRAC method, which indicates that the proposed electrodes are useful for the determination of antioxidant capacity.

# 5. Referencias

[1] B. Halliwell. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. 141 (2006) 312.

[2] M. Carocho, I.C.Ferreira. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol., 51 (2013) 15.

[3] L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas, I. C. F. R. Ferreira. Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem. 111 (2008) 61.

[4] P. Kilmartin, H. Zou, A. Waterhouse. Polarographic study of hydrogen anodic current and its application to antioxidant activity determination. J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1957.

[5] E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, A. Shevchuk. Study of antioxidant properties by voltammetry. J. Electroanal. Chem. 518 (2002) 56.

[6] O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. Biochim. Biophys. Acta. 1721 (2005) 174.

[7] P. A. Kilmartin, H. Zou, A. L. Waterhouse. Polarographic study of hydrogen anodic current and its application to antioxidant activity determination. Am. J. Enol. Vitic. 53 (2002) 294.

[8] J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J.
M. Rodríguez Mellado. Simple Electrochemical Method for the Fast Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles: Comparison with DPPH Assay. Molecules 17 (2012) 5126.

[9] A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. F. Arteaga, J. M. Rodriguez Mellado. Analysis of the interaction of radical scavengers with ROS electrogenerated from hydrogen peroxide. J. Electrochem. Soc. 160 (4) (2013) H213.

[10] A. Palma, M. R. Montoya, J. F. Arteaga, J. M. R. Mellado. Determination of antioxidant activity of spices and their active principles by Differential Pulse Voltammetry. J. Agr. Food Chem. 62(3) (2014) 582.

[11] R. E. Brito, J. M. R. Mellado, A. Palma, M. R. Montoya, J. F. Arteaga. Elucidation of the electrochemical oxidation mechanism of the antioxidant sesamol on a glassy carbon electrode. J. Electrochem. Soc. 161(12) (2014) H854.

[12] L. A. Khanova, Yu. E. Evstefeeva. Reduction of oxygen and hydrogen peroxide on electrodes with adsorbed monolayer of aliphatic compounds. Russ.J. Electrochem. 42 (2006) 1079.

[13] D. Ž. Sužnjević, F. T. Pastor, S. Ž. Gorjanović. Polarographic study of hydrogen anodic current and its application to antioxidant activity determination. Talanta 85 (2006) 1398.

[14] S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, N. I. Potkonjak, I. Leskošek-Čukalović,
D. Ž. Suznjević. Application of a Novel Antioxidative Assay in Beer Analysis and
Brewing Process Monitoring. J. Agr. Food Chem. 58 (2010) 744.

[15] S. Ž. Gorjanović, M. M. Novaković, P. V. Vukosavljević, F. T. Pastor, V. V. Tešević, D. Ž. Sužnjević. Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant of strong alcohol beverages. J. Agr. Food Chem. 58 (2010) 8400.

[16] M. M. Novaković, S. M. Stevanović, S. Ž. Gorjanović, P. M. Jovanovic, V.
V. Tešević, M. A. Janković, D. Ž. Sužnjević, J. Food Sci. 76 (2011) C663.

[17] A. Palma, M. Ruiz Montoya, M. J. Díaz, J. F. Arteaga, R. Estévez Brito y J.
M. Rodríguez Mellado. Evaluation of synergistic and antagonistic effects between some selected antioxidants by means of an electrochemical technique.
Int. J. Food Sci. Technol. 52 (2017) 1639

[18] P. Rivas y J. M. Rodríguez Mellado. Seeking a reliable electrode for the monitoring of the hydrogen peroxide reduction in the presence of antioxidants. Electrochim. Acta 171 (2015) 150-155

[19] J. Agrisuelas, J.J. García-Jareño, P. Rivas, J. M. Rodríguez Mellado y F. Vicente. Electrochemistry and electrocatalysis of a Pt@poly(neutral red) hybrid nanocomposite. Electrochim. Acta 171 (2015) 165

[21] M. P. Rivas Romero, J. M. Luque-Centeno, R. Estévez Brito, R. Rodríguez-Amaro y J. M. Rodríguez Mellado. Application of polyphenazine films doped with metal nanoparticles for the measurements of antioxidant capacity. J. Electroanal. Chem. 789 (2017) 24

[22] M.P. Rivas Romero, J. González-Rodríguez, R. Rodríguez-Amaro y J. M. Rodríguez Mellado. Evolution of Pt and Ag nanoparticles composites with polyphenazines onto ITO electrodes during the oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with ascorbic acid. Electrochim. Acta 271 (2018) 203

[23] M. P. Rivas Romero, R. Estévez Brito, A. Palma, M. Ruiz Montoya, J. M. Rodríguez Mellado y R. Rodríguez-Amaro. An electrochemical method for the determination of antioxidant capacities applied to components of spices and condiments. J. Electrochem. Soc. 164 (2017) B97

[24] M.P. Rivas Romero, R. Estévez Brito, J. M. Rodríguez Mellado, J. González-Rodríguez, M. Ruiz Montoya y R. Rodríguez-Amaro. Exploring the relation between composition of extracts of healthy foods and their antioxidant capacities determined by electrochemical and spectrophotometric methods. LWT - Food Sci. Technol. 95 (2018) 157.

[25] F. Arjmand, A. Adriaens. Influence of pH and chloride concentration on the corrosion behavior of unalloyed copper in NaCl solution: A comparative study between the micro and macro scales. Materials 5 (2012) 2439 y referencias citadas.

[26] D. Egas Ribadeneira, Microscopia Electrónica: Fundamentos, Teoría y Aplicaciones (Tesis Doctoral, Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería, Quito, Ecuador) (1998).