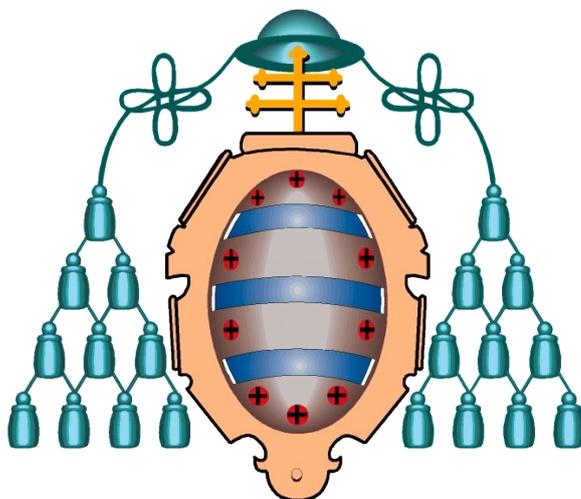


# APLICACIONES ELECTROANALÍTICAS DE QUANTUM DOTS Y NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO

TESIS DOCTORAL

DANIEL MARTÍN YERGA

Oviedo – Mayo 2016



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado: Química Física y Analítica





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| 1.- Título de la Tesis   |   |
|--|---|
| Español/Otro Idioma: Aplicaciones electroanalíticas de quantum dots y nanopartículas de fosfato de titanio | Inglés: Electroanalytical applications of quantum dots and titanium phosphate nanoparticles |
| 2.- Autor  |   |
| Nombre:<br>Daniel Martín Yerga   | DNI/Pasaporte/NIE:  |
| Programa de Doctorado: Química Física y Analítica  |   |
| Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado   |   |

### RESUMEN (en español)

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue el estudio de diferentes aplicaciones electroanalíticas usando dos tipos de nanopartículas semiconductoras: quantum dots y fosfato de titanio.

Los **electrodos serigrafiados** son una herramienta muy utilizada para el desarrollo de biosensores electroquímicos, y fueron utilizados a lo largo de este trabajo. Sin embargo, poco se conoce sobre el comportamiento electroquímico a nivel estructural de su superficie heterogénea. Por esta razón, en primer lugar, se afrontó el estudio del comportamiento electroquímico localizado de electrodos serigrafiados utilizando técnicas electroquímicas y estructurales microscópicas con alta resolución espacial, para correlacionar la actividad electroquímica, visualizada de forma dinámica, con la estructura electródica.

Los **quantum dots** son nanopartículas semiconductoras de compuestos metálicos, que presentan unas propiedades ópticas y electroquímicas muy interesantes, y son ampliamente utilizadas en aplicaciones con fundamento óptico, energético o bioanalítico. Sus propiedades dependen fuertemente del tamaño, por lo que es importante su caracterización. Diferentes aplicaciones utilizando quantum dots fueron desarrolladas en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se desarrolló un método sencillo, rápido, barato y muy sensible para la determinación de la concentración y tamaño de quantum dots en medio acuoso y orgánico. Por otro lado, se utilizaron quantum dots como marca de biosensores electroquímicos integrados, desarrollándose un método para su determinación *in situ* sobre la superficie de electrodos serigrafiados, en la misma plataforma donde se realiza el bioensayo previo. Diferentes biosensores para especies de interés fueron optimizados: para la detección de biotina, y para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. Por otro lado, las propiedades electrónicas y superficiales de los quantum dots conducen a la posibilidad de una reducción (y re-oxidación) selectiva de plata sobre su superficie. Este proceso es estudiado en profundidad con técnicas electroquímicas y estructurales, obteniendo información sobre la diferente nucleación y crecimiento de nanopartículas de plata sobre los quantum dots y sobre una superficie de carbono. Se describen dos posibles aplicaciones de este proceso como son la generación de superficies nanoestructuradas localizadas y la detección sensible de quantum dots.

Las **nanopartículas de fosfato de titanio** tienen un gran poder de intercambio iónico, propiedad que les permite ser funcionalizadas con metales electroactivos que pueden utilizarse en diferentes aplicaciones, siendo la más destacada su empleo como marca de detección de biosensores electroquímicos. En este trabajo, se evalúan las propiedades electroquímicas de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata, bismuto, cobre, mercurio y cadmio, con el objetivo de obtener una marca de detección muy sensible por la introducción de una cantidad muy alta de metal en su estructura. Diferentes métodos electroquímicos de detección de estas nanopartículas son optimizados, con especial énfasis en la detección simultánea para su empleo en biosensores multianalito. Dos estrategias de funcionalización con biomoléculas se llevan a cabo, demostrando la utilidad de ambas en sistemas bioanalíticos. La capacidad de estas nanopartículas de utilizarse como marca en biosensores electroquímicos desechables es evaluada con la reacción de afinidad biotina-estreptavidina, y a continuación, se llevó a cabo un



biosensor multianálito para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. Por último, se estudia el potencial electrocatalítico de las nanopartículas de fosfato de titanio hacia algunas reacciones electroquímicas muy importantes como son la reacción de evolución de hidrógeno, la reducción de peróxido de hidrógeno, y la oxidación de glucosa.

### RESUMEN (en Inglés)

The aim of this PhD. Thesis was to study different electroanalytical applications using two types of semiconductor nanoparticles: quantum dots and titanium phosphate.

**Screen-printed electrodes** are widely used for the development of electrochemical biosensors, and were used as the main tool throughout this work. However, little is known about the electrochemical behaviour at the structural level of its heterogeneous surface. For this reason, firstly, it was studied the localized electrochemical behaviour of screen-printed electrodes using electrochemical and structural microscopic techniques with high spatial resolution, and the electrochemical activity was correlated to the electrode structure.

**Quantum dots** are semiconductor nanoparticles of metallic compounds, which have very interesting optical and electrochemical properties, and are widely used in optical, energy and bioanalytical applications. Different applications using quantum dots were developed. First, a simple, fast, inexpensive and very sensitive electrochemical method for the determination of the concentration and size of quantum dots in aqueous and organic media was carried out.

Quantum dots were also employed as label in integrated electrochemical biosensors, and a method for the *in situ* determination of these nanoparticles on the surface of screen-printed electrodes was developed. Different biosensors were optimized using this strategy: for the detection of biotin and for the detection of celiac disease biomarkers. Furthermore, the special electronic and surface properties of quantum dots led to the possibility of a selective reduction (and stripping) of silver on its surface. This process was studied in depth with electrochemical and structural techniques, obtaining information on the different nucleation and growth of silver nanoparticles on quantum dots and on a carbon surface. Two possible applications were described: the generation of localized nanostructured surfaces and the sensitive detection of quantum dots.

**Titanium phosphate nanoparticles** have excellent ion-exchange properties that allows them to be functionalized with electroactive metals and used in different applications, being the most prominent as a detection label of electrochemical biosensors. In this work, the electrochemical properties of titanium phosphate nanoparticles modified with silver, bismuth, copper, mercury and cadmium were evaluated with the aim to obtain a very sensitive detection label. Different electrochemical detection methods of these nanoparticles are optimized, with special emphasis on the simultaneous detection in order to be used in a multiplexing biosensor. Two strategies of functionalization with biomolecules are performed, showing the utility of both in bioanalytical systems. The ability of these nanoparticles as label of disposable electrochemical biosensors was tested using the biotin-neutravidin affinity reaction and for the detection of celiac disease biomarkers. Finally, the electrocatalytic capability of the titanium phosphate nanoparticles to some very important electrochemical reactions such as the hydrogen evolution reaction, hydrogen peroxide reduction and glucose oxidation, is studied.

# RESUMEN

---

El progreso de la nanotecnología ha mejorado sensiblemente las propiedades de una enorme variedad de aplicaciones, tanto científicas como tecnológicas. Las nanopartículas, materiales cuyas dimensiones tridimensionales se encuentran en el orden de los nanómetros, presentan características muy interesantes debido a un elevado área superficial, y a sus novedosas propiedades ópticas, electrónicas y mecánicas. El estudio y conocimiento de las propiedades de diferentes nanomateriales es un asunto de gran interés en la comunidad científica. Además, cada día se describen nuevos nanomateriales en un proceso que parece no tener fin. La electroquímica ha sido una disciplina especialmente beneficiada por el desarrollo de la nanociencia. Las técnicas electroquímicas pueden ser utilizadas para investigar las propiedades de los nanomateriales, y a su vez, estas propiedades pueden ser utilizadas para mejorar las aplicaciones de fundamento electroquímico, especialmente en electroanálisis. Las nanopartículas pueden funcionar en electrodos de diferentes maneras, entre las que destacan: como material electródico (para mejorar la transferencia electrónica), como catalizador de reacciones electroquímicas o como marca de detección de biosensores.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el estudio de diferentes aplicaciones electroanalíticas usando dos tipos de nanopartículas semiconductoras: quantum dots y fosfato de titanio. Los **electrodos serigrafiados** son una herramienta muy utilizada para el desarrollo de biosensores electroquímicos, y son la herramienta electródica utilizada a lo largo de este trabajo. Sin embargo, poco se conoce sobre el comportamiento electroquímico a nivel estructural de su superficie heterogénea. Por esta razón, en primer lugar, se afronta el estudio del comportamiento electroquímico localizado de los electrodos serigrafiados de carbono utilizando técnicas electroquímicas y estructurales microscópicas. Estas técnicas han permitido obtener información con una alta resolución espacial usando una sonda sub-micrométrica, la actividad electroquímica localizada de los electrodos serigrafiados ha podido ser visualizada de forma dinámica y se ha correlacionado con su microestructura. La actividad electroquímica de dos especies redox muy empleadas en electroquímica como el hexaaminrutenio y la dopamina es evaluada. Los resultados obtenidos proporcionan

conocimientos fundamentales de la respuesta electroquímica de una superficie electródica muy compleja, heterogénea y rugosa como la de los electrodos serigrafiados de carbono.

Los **quantum dots** son nanopartículas semiconductoras de compuestos metálicos, que presentan unas propiedades ópticas y electroquímicas muy interesantes, y son utilizadas ampliamente en aplicaciones con fundamento óptico, energético o en bioanálisis. Sus propiedades dependen fuertemente del tamaño de la nanopartícula, por lo que es muy importante su correcta caracterización. Además, muchas de estas nanopartículas están fabricadas con metales pesados, y por tanto, son potencialmente tóxicas, hecho que abre la necesidad de su control. En este trabajo se desarrolló un método electroquímico sencillo, barato, rápido y muy sensible para la determinación del tamaño y concentración de quantum dots de cadmio, que puede ayudar a complementar las técnicas espectroscópicas que se utilizan rutinariamente en la actualidad. La utilización de electrodos serigrafiados modificados con una película de bismuto permite detectar concentraciones muy pequeñas de los quantum dots, y las técnicas electroquímicas muestran una gran capacidad para resolver diferencias de tamaño muy pequeñas y la posibilidad de detectar un amplio rango de tamaños. Los quantum dots pueden utilizarse como marca de detección en biosensores electroquímicos tras la medida de los metales que los componen, normalmente electroactivos. En esta Tesis Doctoral, se pone a punto un biosensor integrado donde tanto la reacción de reconocimiento biológico como la detección de los quantum dots se lleva a cabo *in situ* sobre la superficie de tarjetas serigrafiadas de 8 canales. La optimización y evaluación analítica del procedimiento desarrollado se lleva a cabo utilizando la reacción de afinidad biotina-estreptavidina, y se aplica a la detección de biotina en un ensayo competitivo. Esta metodología se utiliza, a continuación, en un sistema biosensor más complejo para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. En primer lugar, se detectan anticuerpos IgG anti-transglutaminasa con una estrategia de varias etapas de reacción. Tras comprobar su correcto comportamiento, se busca la mejora del sistema desarrollado con el fin de disminuir el número de etapas y tiempo de análisis. Esto se lleva a cabo para la detección de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa. En este caso, una simple estrategia de inmovilización es utilizada para mejorar la eficiencia de la modificación del transductor con el elemento de reconocimiento, resultando en una disminución de la adsorción no específica y la posibilidad de evitar una etapa de bloqueo adicional. Dos estrategias son descritas y evaluadas, una estrategia multi-etapa, con lavados intermedios entre las reacciones biológicas, y otra de etapa única para el bioensayo, que simplifica el sistema biosensor acercándolo a un dispositivo más útil para su uso de forma descentralizada.

Por otro lado, las propiedades electrónicas y superficiales de los quantum dots conducen a la posibilidad de una reducción (y re-oxidación) selectiva de plata sobre su superficie. Este proceso es estudiado en profundidad con técnicas electroquímicas y estructurales, obteniendo información sobre la diferente nucleación y crecimiento de nanopartículas de plata sobre los quantum dots y sobre una superficie de carbono. Se describen dos posibles aplicaciones de este proceso como son la generación de superficies nanoestructuradas localizadas y la detección sensible de quantum dots.

Las **nanopartículas de fosfato de titanio** tienen un gran poder de intercambio iónico, propiedad que les permite ser funcionalizadas con metales electroactivos que pueden utilizarse en diferentes aplicaciones, siendo la más destacada su empleo como marca de detección de biosensores electroquímicos. En este trabajo, se evalúan las propiedades electroquímicas de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata, bismuto, cobre, mercurio y cadmio, con el objetivo de obtener una marca de detección muy sensible por la introducción de una cantidad muy alta de metal en su estructura. Diferentes métodos electroquímicos de detección de estas nanopartículas son optimizados, con especial énfasis en la detección simultánea para su empleo en biosensores multianalito. Dos estrategias de funcionalización con biomoléculas se llevan a cabo, demostrando la utilidad de ambas en sistemas bioanalíticos. La capacidad de estas nanopartículas de utilizarse como marca en biosensores electroquímicos desechables es evaluada con la reacción de afinidad biotina-estreptavidina, y a continuación, se lleva a cabo un biosensor multianalito para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. Por último, se estudia el potencial electrocatalítico de las nanopartículas de fosfato de titanio hacia algunas reacciones electroquímicas muy importantes como son la reacción de evolución de hidrógeno, la reducción de peróxido de hidrógeno, y la oxidación de glucosa.

## ABSTRACT

---

The progress of the nanotechnology has improved significantly the properties of a wide variety of scientific and technological applications. Nanoparticles, materials with at least one dimension in the order of nanometers, have very interesting characteristics due to the high surface area, and novel optical, electronic and mechanical properties. The study and knowledge of the properties of different nanomaterials is a matter of great interest for

the scientific community. In addition, every day, new nanomaterials are described in an endless process. Electrochemistry is a discipline especially enhanced by the development of nanoscience. Electrochemical techniques can be used to investigate the properties of nanomaterials, and in return, these properties can be used to improve applications with electrochemical foundations, specially in electroanalysis. Nanoparticles can be used in electrodes in different ways: as electrode material (to improve electronic transfer), as a catalyst of electrochemical reactions or as detection label for biosensors.

The aim of this PhD. Thesis is the study of different electroanalytical applications using two kinds of semiconductor nanoparticles: quantum dots and titanium phosphate. **Screen-printed electrodes** are widely used for the development of electrochemical biosensors, and therefore, they were the electrodes used throughout this work. However, little is known about its electrochemical behavior at the microstructural level of its highly heterogeneous surface. For this reason, the study of the localized electrochemical behavior of screen-printed carbon electrodes using electrochemical and structural microscopic techniques was performed. These techniques allowed to obtain information with high spatial resolution using submicron probes, and the localized electrochemical activity of screen-printed electrodes has been dynamically obtained and correlated with their microstructure. The electrochemical activity of two redox species widely employed such as hexaammineruthenium and dopamine was evaluated. The results have provided fundamental knowledge of the electrochemical response of the complex, heterogeneous and rough-like surface of screen-printed electrodes.

**Quantum dots** are semiconductor nanoparticles of metal compounds that exhibit interesting optical and electrochemical properties, and are widely used in optical applications, energy or bioassays. Its properties depend strongly on the size of the nanoparticle, and therefore, its correct characterization is very important. Many of these nanoparticles are fabricated with heavy metals, being potentially toxic, fact that opens the need for analytical control. This Thesis describes a simple, inexpensive, fast and very sensitive electrochemical method for the determination of the size and concentration of cadmium-based quantum dots. Screen-printed electrodes modified with a bismuth film are able to detect a very small concentration of quantum dots, and the electrochemical techniques showed great ability to resolve small size differences in a wide size range. The quantum dots can be used as detection label in electrochemical biosensors after the measurement of its electroactive metals. In this Thesis, an integrated biosensor where both the biological recognition reaction and the electrochemical detection are performed *in situ* on the sur-

face of 8-channel screen-printed cards. The optimization and evaluation of the analytical procedure is carried out using the streptavidin-biotin affinity reaction, and applied to the detection of biotin in a competitive assay. This methodology is, then, employed in a more complex biosensing system for the detection of celiac disease biomarkers. First, anti-transglutaminase IgG antibodies are detected with a multi-step strategy. After evaluation of the correct behaviour and detection, the biosensing system is improved in order to reduce the number of steps and the analysis time for the detection of anti-transglutaminase IgA antibodies. In this case, a simple strategy of immobilization is used to improve the efficiency of the transducer modification with the recognition element, resulting in a decrease of the non-specific adsorption and avoiding the additional blocking step. Two strategies are described and evaluated, a multi-step strategy, with intermediate washing between the biological reactions, and a single-step bioassay, which simplifies the biosensor system improving its characteristics for decentralized use. Furthermore, electronic and surface properties of the quantum dots led to the possibility of a selective reduction (and reoxidation) of silver on its surface. This process was studied in depth with electrochemical and microscopic techniques, obtaining interesting information about the different nucleation and growth mechanisms of silver nanoparticles on quantum dots and on a carbon surface. Two possible applications of this method are proposed such as the generation of localized nanostructured surfaces and the sensitive detection of quantum dots.

**Titanium phosphate nanoparticles** have excellent ion-exchange properties that allows them to be functionalized with electroactive metals and used in different applications, being the most prominent as a detection label of electrochemical biosensors. In this work, the electrochemical properties of titanium phosphate nanoparticles modified with silver, bismuth, copper, mercury and cadmium were evaluated with the aim to obtain a very sensitive detection label. Different electrochemical detection methods of these nanoparticles are optimized, with special emphasis on the simultaneous detection in order to be used in a multiplexing biosensor. Two strategies of functionalization with biomolecules are performed, showing the utility of both in bioanalytical systems. The ability of these nanoparticles as label of disposable electrochemical biosensors was tested using the biotin-neutravidin affinity reaction and for the detection of celiac disease biomarkers. Finally, the electrocatalytic capability of the titanium phosphate nanoparticles to some very important electrochemical reactions such as the hydrogen evolution reaction, hydrogen peroxide reduction and glucose oxidation, is studied.



## PUBLICACIONES

---

El trabajo experimental, teórico y bibliográfico desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos científicos:

1. D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, *"Biosensor array based on the in situ detection of quantum dots as electrochemical label"*, *Sens. Actuators, B.* 182 (2013) 184–189.
2. D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, *"Electrochemical immunosensor for anti-tissue transglutaminase antibodies based on the in situ detection of quantum dots"*, *Talanta* 130 (2014) 598–602.
3. D. Martín-Yerga, J. Carrasco-Rodríguez, M.B. González-García, F.J. García Alonso, A. Costa-García, *"Determination of Silver-Modified Titanium Phosphate Nanoparticles by Voltammetric and Electrocatalytic Methods"*, *Electroanalysis* 26(12) (2014) 2574-2579.
4. D. Martín-Yerga, A. Costa-García, *"EDITORIAL: Electrochemical Immunosensors for Celiac Disease Detection"*, *Int. J. Celiac Dis.* 2(4) (2014) 142-143.
5. D. Martín-Yerga, D. Bouzas-Ramos, M. Menéndez-Miranda, A. R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, A. Costa-García, *"Voltammetric determination of size and particle concentration of Cd-based quantum dots"*, *Electrochim. Acta* 166 (2015) 100-106.
6. D. Martín-Yerga, A. Costa-García, *"Towards a blocking-free electrochemical immunosensing strategy for anti-transglutaminase antibodies using screen-printed electrodes"*, *Bioelectrochem.* 105 (2015) 88-94.
7. D. Martín-Yerga, E. Costa Rama, A. Costa-García, *"Electrochemical study and applications of the selective electrodeposition of silver on quantum dots"*, *Anal. Chem.* (2016).

Varias publicaciones adicionales sobre el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se encuentran actualmente en preparación o enviados:

1. D. Martín-Yerga, J. Carrasco-Rodríguez, J. L. García-Fierro, F.J. García-Alonso, A. Costa-García, "Non-enzymatic electrochemical determination of glucose using copper-modified titanium phosphate nanoparticles".
2. D. Martín-Yerga, A. Costa-García, P. R. Unwin, "Correlative Voltammetric Microscopy: Structure-Activity Relationships in the Microscopic Electrochemical Behaviour of Screen Printed Carbon Electrodes".
3. D. Martín-Yerga, J. Carrasco-Rodríguez, F.J. García-Alonso, A. Costa-García, "Multiplexing detection of celiac disease biomarkers using metal-modified titanium phosphate nanoparticles".
4. J. Carrasco-Rodríguez, D. Martín Yerga, F.J. García Alonso, A. Costa-García, "Modulated ion exchange in titanium phosphate nanoparticles and functionalization thereof".

Además, el autor ha publicado, durante su etapa predoctoral, otros artículos científicos con menor relación al contenido de esta Tesis Doctoral:

1. D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, "Use of nanohybrid materials as electrochemical transducers for mercury sensors", *Sens. Actuators, B*, 165 (2012) 143–150.
2. D. Martín-Yerga, M.B. González-García, A. Costa-García, "Electrochemical determination of mercury: A review", *Talanta*. 116 (2013) 1091–1104.
3. D. Martín-Yerga, M.C. Blanco-López, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, "Dispositivos Point-of-Use para análisis", *Boletín GRASEQA* 8 (2014) 29–43.
4. E. Fernández, L. Vidal, D. Martín-Yerga, M. C. Blanco, A. Canals, A. Costa-García, "Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples". *Talanta* 135 (2014) 34-40.
5. A. Sánchez Calvo, C. Botas, D. Martín-Yerga, P. Álvarez, R. Menéndez, A. Costa-García, "Comparative study of screen-printed electrodes modified with graphene oxides reduced by a constant current". *J. Electrochem. Soc.* 162(10) (2015) B282-B290.

6. D. Martín-Yerga, E. Costa-Rama, A. Costa-García, "Electrochemical characterization of ordered mesoporous carbon screen-printed electrodes". *J. Electrochem. Soc.* 163(5) (2016) B176-B179.

Y otros trabajos se encuentran en preparación o enviados:

1. D. Martín-Yerga, E. Costa Rama, A. Costa-García, "Electrochemical study and determination of electroactive species with screen-printed electrodes", *J. Chem. Educ.*
2. B. Pérez-Fernández, D. Martín-Yerga, A. Costa-García, "Electrodeposition of nickel nanoflowers on screen-printed electrodes and its application to non-enzymatic sugars determination", *RSC Adv.*
3. I. Álvarez-Martos, D. Martín-Yerga, C. Blanco-López, C. S. Henry, M. T. Fernández-Abedul, "Point-of-use simultaneous electrochemical detection of lead and cadmium using low-cost screen-printed transparency electrodes".

#### Capítulos de libro

1. "Nanomaterials as disposable transducers for lead and mercury sensors". Daniel Martín Yerga, Agustín Costa García, *Recent Advances within the field of materials science in Spain*. Servicio de publicaciones de la Universidad de Alicante. 2014.

#### Comunicaciones en congresos

##### Comunicaciones orales

1. "Titanium phosphate nanoparticles as electrochemical label for biosensors". VI Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Alcalá de Henares (España). Julio 2013.
2. "Caracterización electroquímica de Quantum Dots". II Jornada de NanoBioAnálisis (NBA). Oviedo (España). Julio 2013.
3. "Nanopartículas de fosfato de titanio en biosensores". II Jornada de NanoBioAnálisis (NBA). Oviedo (España). Julio 2013.

4. *"Screen-Printed Electrode-Based Electrochemical Detector Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Determination of Mercury in Water Samples"* 16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech). Crete (Grecia). Mayo 2014.
5. *"Selective catalytic electrodeposition of silver on quantum dots as electrochemical label for biosensors"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.
6. *"Modulated ion exchange in Titanium Phosphate Nanoparticles and functionalization thereof"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.

#### Comunicaciones tipo póster

1. *"Utilización de materiales nanohíbridos como transductores de sensores de mercurio"*. V Workshop de Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Toledo (España). Septiembre 2011.
2. *"Disposable electrochemical biosensor arrays for the detection of celiac disease"*. 3rd International Conference on Biosensing Technology. Sitges (España). Mayo 2013.
3. *"Titanium phosphate nanoparticles as electrochemical label for biosensors"*. VI Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Alcalá de Henares (España). Julio 2013.
4. *"Electrochemical characterization of graphene oxides using screen-printed electrodes"*. Graphene Conference. Toulouse (Francia). Mayo 2014.
5. *"Determination of silver-modified titanium phosphate nanoparticles by electrochemical methods"*. 4th International Workshop on Analytical Miniaturization (WAM-NANO). Copenhagen (Dinamarca). Junio 2014.
6. *"Determination of glucose using the electrocatalytic activity of silver-modified titanium phosphate nanoparticles towards hydrogen peroxide reduction"*. XXXV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Burgos (España). Julio 2014.

7. *"Electrochemical characterization of electrochemically reduced graphene oxides on screen-printed electrodes"*. XXXV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Burgos (España). Julio 2014.
8. *"Electrochemical determination of mercury in environmental and drinking waters by using ionic liquid microextraction"*. XXXV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Burgos (España). Julio 2014.
9. *"Electrodeposition of nickel nanoparticles on screen-printed electrodes for the determination of reducing sugars in food"*. XXXV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Burgos (España). Julio 2014.
10. *"Selective catalytic electrodeposition of silver on quantum dots as electrochemical label for biosensors"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.
11. *"Modulated ion exchange in Titanium Phosphate Nanoparticles and functionalization thereof"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.
12. *"Arsenic determination using different nanostructured electrode platforms"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.
13. *"Novel nanostructured cellulose-based electrochemical transducers"*. VII Workshop en Nanociencia y Nanotecnología Analíticas (NyNA). Salamanca (España). Julio 2015.



# DECLARACIÓN

---

En este apartado se especifican las contribuciones experimentales a esta Tesis Doctoral que el autor no ha llevado a cabo. Esta Tesis Doctoral consiste completamente en mi propio trabajo exceptuando algunos experimentos/análisis que se han llevado a cabo en colaboración con otros investigadores:

- En el Capítulo 3, las imágenes de SEM fueron obtenidas con la ayuda de Minkyung Kang. El análisis y mapeo con espectroscopia Raman fueron obtenidos con la ayuda del Dr. Aleix G. Güell. La imagen SEM de la figura 2.3 fue realizada por Danqing Liu.
- El Capítulo 4 es un trabajo llevado a cabo en colaboración con el grupo de “Espectrometría Analítica” de la Universidad de Oviedo. La síntesis y caracterización espectroscópica de los quantum dots fueron realizadas por Mario Menéndez y Antonio Montoro. La optimización de algunas medidas electroquímicas fue llevada a cabo por Diego Bouzas bajo mi supervisión.
- Algunas de las imágenes de Microscopía electrónica de barrido del Capítulo 7 fueron realizadas por Estefanía Costa.
- El trabajo de las nanopartículas de fosfato de titanio (Capítulos 8, 9 y 10) ha sido un trabajo en colaboración con el grupo de “Polímeros nanoestructurados” dirigido por el Prof. Francisco J. García Alonso. Aunque en el inicio de esta investigación, realicé la síntesis y funcionalización de estas nanopartículas, en los meses posteriores, la síntesis y caracterización estructural fue llevada a cabo por Javier Carrasco, trabajo que formará parte de su Tesis Doctoral. Por tanto, aunque en la presente Tesis Doctoral solamente se discutirán las características estructurales con especial relevancia al trabajo presentado, un mayor conocimiento fundamental de estas nanopartículas se ha obtenido gracias a esta colaboración. Específicamente, las figuras 8.1, 8.4, 9.4, 10.4, 10.13 y 10.14, fueron obtenidas del trabajo experimental llevado a cabo por el investigador mencionado. El Prof. J. L. García Fierro realizó el análisis XPS que se presenta en la figura 10.15.

*Oviedo, Mayo 2016*

---

Daniel Martín Yerga



# ÍNDICE

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1      | Electrodos serigrafiados . . . . .                           | 1          |
| 1.2      | Sensores y biosensores electroquímicos . . . . .             | 14         |
| 1.2.1    | Biosensores electroquímicos . . . . .                        | 30         |
| 1.2.2    | Marcas de biosensores electroquímicos . . . . .              | 34         |
| 1.2.3    | Modelos de biosensores estudiados . . . . .                  | 41         |
| 1.3      | Nanotecnología . . . . .                                     | 48         |
| 1.3.1    | Electrodos modificados con nanomateriales . . . . .          | 50         |
| 1.3.2    | Quantum dots . . . . .                                       | 61         |
| 1.3.3    | Nanopartículas de fosfato de titanio . . . . .               | 72         |
| 1.4      | Electroquímica dinámica y técnicas electroquímicas . . . . . | 76         |
| 1.4.1    | Técnicas voltamperométricas . . . . .                        | 86         |
| 1.4.2    | Cronotécnicas . . . . .                                      | 98         |
| 1.4.3    | Espectroscopia de impedancia electroquímica . . . . .        | 100        |
| 1.4.4    | Microscopía de barrido electroquímico . . . . .              | 106        |
| 1.5      | Objetivos . . . . .  | 113        |
| <b>2</b> | <b>EXPERIMENTAL</b>  | <b>115</b> |
| 2.1      | Instrumentación . . . . .                                    | 115        |
| 2.1.1    | Aparatos . . . . .   | 115        |
| 2.1.2    | Electrodos serigrafiados . . . . .                           | 117        |
| 2.1.3    | Microscopio de celda electroquímica de barrido . . . . .     | 117        |
| 2.1.4    | Electrodo de referencia de Ag/AgCl . . . . .                 | 119        |
| 2.1.5    | <i>Software</i> específico . . . . .                         | 121        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 2.2      | Reactivos y disoluciones . . . . .  | 122        |
| 2.2.1    | Reactivos comunes . . . . .   | 122        |
| 2.2.2    | Nanomateriales de carbono . . . . .   | 122        |
| 2.2.3    | Reactivos biológicos . . . . .  | 124        |
| 2.2.4    | Disoluciones . . . . .  | 125        |
| 2.3      | Procedimientos experimentales . . . . .   | 125        |
| 2.3.1    | Nanoestructuración de electrodos . . . . .  | 125        |
| 2.3.2    | Síntesis de quantum dots de CdSe y CdSe/ZnS . . . . .   | 126        |
| 2.3.3    | Determinación espectroscópica de la concentración y tamaño de quantum dots . . . . .          | 128        |
| 2.3.4    | Electrodeposición de plata sobre rejillas de TEM . . . . .                                    | 129        |
| 2.3.5    | Representación del modelo de nucleación de Scharifker-Hills . . . . .                         | 129        |
| 2.3.6    | Síntesis de nanopartículas de fosfato de titanio . . . . .                                    | 131        |
| 2.3.7    | Funcionalización de nanopartículas de fosfato de titanio . . . . .                            | 133        |
| 2.3.8    | Tratamiento de muestras reales . . . . .  | 137        |
| 2.3.9    | Medidas por espectroscopía de impedancia electroquímica . . . . .                             | 137        |
| 2.3.10   | Cálculo del límite de detección . . . . .   | 138        |
|          | <b>Caracterización de electrodos serigrafiados de carbono</b>                                 | <b>139</b> |
| <b>3</b> | <b>CORRELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ELECTROQUÍMICA EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO</b> | <b>141</b> |
| 3.1      | Introducción . . . . .  | 141        |
| 3.2      | Electroquímica del hexaminrutenio en electrodos serigrafiados de carbono . . . . .            | 142        |
| 3.3      | Electroquímica de la dopamina en electrodos serigrafiados de carbono . . . . .                | 145        |
| 3.4      | Conclusiones . . . . .  | 157        |
|          | <b>Aplicaciones electroanalíticas de quantum dots</b>   | <b>159</b> |
| <b>4</b> | <b>CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE QUANTUM DOTS</b>   | <b>161</b> |
| 4.1      | Introducción . . . . .  | 161        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.2      | Procedimientos experimentales . . . . .   | 163        |
| 4.2.1    | Caracterización espectroscópica de quantum dots . . . . .   | 163        |
| 4.2.2    | Digestión y medidas voltamperométricas de quantum dots . . . . .  | 165        |
| 4.3      | Optimización de electrodos serigrafiados modificados con bismuto para la<br>detección de Cd(II) . . . . . | 167        |
| 4.3.1    | Caracterización de la superficie electródica . . . . .  | 168        |
| 4.4      | Optimización de las condiciones experimentales para la detección de quan-<br>tum dots . . . . .           | 170        |
| 4.4.1    | Quantum dots de CdSe en medio orgánico . . . . .  | 170        |
| 4.4.2    | Quantum dots de CdSe/ZnS en medio acuoso . . . . .  | 172        |
| 4.5      | Determinación electroquímica de la concentración de quantum dots . . . . .                                | 173        |
| 4.5.1    | Quantum dots de CdSe en medio orgánico . . . . .  | 173        |
| 4.5.2    | Quantum dots de CdSe/ZnS en medio acuoso . . . . .  | 173        |
| 4.6      | Determinación del tamaño de quantum dots . . . . .  | 175        |
| 4.7      | Conclusiones . . . . .  | 177        |
| <b>5</b> | <b>QUANTUM DOTS COMO MARCA ELECTROQUÍMICA DE BIOSENSORES DESECHA-<br/>BLES</b> . . . . .                  | <b>179</b> |
| 5.1      | Introducción . . . . .  | 179        |
| 5.2      | Procedimientos experimentales . . . . .   | 181        |
| 5.2.1    | Metodología del biosensor para la determinación de biotina usando<br>quantum dots como marca . . . . .    | 181        |
| 5.3      | Optimización del transductor electroquímico . . . . .   | 181        |
| 5.4      | Efecto del potencial de activación y de la digestión ácida . . . . .                                      | 184        |
| 5.5      | Optimización de la digestión ácida de quantum dots . . . . .  | 188        |
| 5.6      | Optimización de las condiciones experimentales del biosensor . . . . .                                    | 188        |
| 5.7      | Comportamiento analítico de electrodos serigrafiados individuales . . . . .                               | 189        |
| 5.8      | Comportamiento analítico de tarjetas serigrafiadas multicanal . . . . .                                   | 190        |
| 5.9      | Ensayo competitivo para la determinación de biotina . . . . .   | 191        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 5.10     | Conclusiones . . . . .   | 193        |
| <b>6</b> | <b>BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD CELÍACA USANDO QUANTUM DOTS COMO MARCA</b>      | <b>195</b> |
| 6.1      | Introducción . . . . .   | 195        |
| 6.2      | Procedimientos experimentales . . . . .  | 197        |
| 6.2.1    | Metodología del biosensor para la determinación de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa usando quantum dots como marca . . . . .  | 197        |
| 6.2.2    | Metodologías del biosensor para la determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa usando quantum dots como marca . . . . . | 198        |
| 6.3      | Optimización de la metodología del biosensor para anticuerpos IgG anti-transglutaminasa . . . . .                                  | 199        |
| 6.3.1    | Estudio de la biofuncionalidad del sensor y la adsorción no específica   | 199        |
| 6.3.2    | Optimización de las condiciones experimentales . . . . .   | 201        |
| 6.4      | Comportamiento analítico del biosensor de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa  | 202        |
| 6.4.1    | Calibración con el inmunosensor . . . . .  | 202        |
| 6.4.2    | Estudios de precisión y estabilidad . . . . .  | 203        |
| 6.5      | Biosensores sin bloqueo para la determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa . . . . .                                   | 204        |
| 6.6      | Inmunoensayo de una etapa para la detección de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa . . . . .                                     | 210        |
| 6.7      | Conclusiones . . . . .   | 213        |
| <b>7</b> | <b>ESTUDIO ELECTROQUÍMICO Y APLICACIONES DE LA ELECTRODEPOSICIÓN SELECTIVA DE PLATA SOBRE QUANTUM DOTS</b>                         | <b>215</b> |
| 7.1      | Introducción . . . . .   | 215        |
| 7.2      | Procedimientos experimentales . . . . .  | 217        |
| 7.2.1    | Detección electroquímica de quantum dots . . . . .   | 217        |
| 7.3      | Estudio electroquímico y estructural de la electrodeposición de plata sobre quantum dots . . . . .                                 | 217        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 7.4   | Nucleación de partículas de plata sobre quantum dots . . . . .   | 228        |
| 7.5   | Nanoestructuras localizadas por electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots . . . . .                                | 231        |
| 7.6   | Detección de quantum dots usando la electrodeposición selectiva de plata . .   | 232        |
| 7.7   | Conclusiones . . . . .   | 234        |
| <b>Aplicaciones electroanalíticas de nanopartículas de fosfato de titanio</b> |  | <b>237</b> |
| <b>8</b>  | <b>CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO</b>   | <b>239</b> |
| 8.1   | Introducción . . . . .   | 239        |
| 8.2   | Caracterización electroquímica de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales . . . . .                         | 240        |
| 8.2.1   | Caracterización morfológica de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales . . . . .                        | 241        |
| 8.2.2   | Estudio voltamperométrico de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales . . . . .                          | 242        |
| 8.2.3   | Comportamiento en diferente medio electrolítico . . . . .  | 244        |
| 8.2.4   | Determinación de la cantidad metálica en nanopartículas de fosfato de titanio . . . . .  | 248        |
| 8.2.5   | Evaluación electroquímica del contra-anión del intercambio . . . . .   | 249        |
| 8.2.6   | Estabilidad y reproducibilidad electroquímica . . . . .  | 251        |
| 8.3   | Evaluación analítica de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales . . . . .                               | 253        |
| 8.3.1   | Método de detección de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio en electrodos serigrafiados . . . . .         | 254        |
| 8.3.2   | Método de detección de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata en electrodos serigrafiados . . . . .          | 256        |
| 8.3.3   | Caracterización de electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre . . . . . | 259        |
| 8.4   | Evaluación de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales para detección multianalito . . . . .                 | 262        |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 8.4.1   | Elección del medio adecuado . . . . .  | 262        |
| 8.4.2   | Evaluación de la multidetección . . . . .  | 262        |
| 8.4.3   | Efecto de la nanoestructuración electródica . . . . .  | 263        |
| 8.4.4   | Detección simultánea de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre y mercurio . . . . .  | 265        |
| 8.5   | Conclusiones . . . . .   | 267        |
| <b>9 EVALUACIÓN DE MTIPNPS COMO MARCA ELECTROQUÍMICA DE BIOSENSORES</b>               |  | <b>269</b> |
| 9.1   | Introducción . . . . .   | 269        |
| 9.2   | Procedimientos experimentales . . . . .  | 271        |
| 9.2.1   | Bioensayo para la detección de biotina usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio como marca . . . . .   | 271        |
| 9.2.2   | Bioensayo de multidetección de anticuerpos IgG/IgA anti-transglutaminasa usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre y mercurio como marca . . . . . | 272        |
| 9.3   | Funcionalización proteica de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales . . . . .  | 274        |
| 9.4   | Biosensor para biotina con nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio como marca . . . . .  | 278        |
| 9.5   | Biosensor multianalito utilizando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre y mercurio . . . . .  | 281        |
| 9.5.1   | Comportamiento analítico del biosensor multidetección . . . . .  | 283        |
| 9.5.2   | Evaluación de la reactividad cruzada . . . . .   | 284        |
| 9.6   | Conclusiones . . . . .   | 285        |
| <b>10 APLICACIONES ELECTROCATALÍTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO</b> |  | <b>287</b> |
| 10.1  | Introducción . . . . .   | 287        |
| 10.2  | Electrocatalisis de la reacción de evolución de hidrógeno usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata . . . . .                                      | 288        |

|        |   |            |
|--------|---|------------|
| 10.3   | Electrocatalisis de la reducci3n de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata y su aplicaci3n a la determinaci3n de glucosa . . . . . | 294        |
| 10.4   | Determinaci3n electroquímica no enzimática de glucosa usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre . . . . .   | 299        |
| 10.4.1 | Respuesta electroquímica de la glucosa en electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre . . . . .                          | 299        |
| 10.4.2 | Optimizaci3n de las condiciones experimentales . . . . .  | 305        |
| 10.4.3 | Comportamiento analítico del detector nanoestructurado . . . . .  | 306        |
| 10.4.4 | Determinaci3n de glucosa en muestras reales . . . . .   | 310        |
| 10.5   | Conclusiones . . . . .  | 312        |
|        | <b>Conclusiones finales</b> . . . . .   | <b>315</b> |
|        | <b>Apéndices</b> . . . . .  | <b>331</b> |
|        | <b>A ALGUNOS ASPECTOS DE ELECTROQUÍMICA</b> . . . . .   | <b>333</b> |
| A.1    | Leyes de Faraday . . . . .  | 333        |
| A.2    | Instrumentaci3n electroquímica . . . . .  | 334        |
| A.3    | Electrodos polarizables . . . . .   | 336        |
| A.4    | Jaula de Faraday . . . . .  | 337        |
|        | <b>B TÉCNICAS DE CARACTERIZACI3N</b> . . . . .  | <b>339</b> |
| B.1    | Microscopía electr3nica de barrido (SEM) . . . . .  | 339        |
| B.1.1  | Espectroscopía de rayos x de energía dispersiva (EDX o EDS) . . . . .   | 340        |
| B.2    | Microscopía electr3nica de transmisi3n (TEM) . . . . .  | 340        |
| B.3    | Espectroscopía de absorci3n ultravioleta-visible (UV/Visible) . . . . .   | 341        |
| B.4    | Espectroscopía infrarroja . . . . .   | 341        |
| B.5    | Espectroscopía de fluorescencia y Microscopía de láser confocal . . . . .   | 341        |
| B.6    | Espectroscopía Raman . . . . .  | 342        |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| B.7 | Dispersión dinámica de luz (DLS) . . . . .                | 342 |
| B.8 | Potencial $\zeta$ . . . . .                               | 343 |
| B.9 | Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) . . . . . | 343 |

|                     |  |            |
|---------------------|--|------------|
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> |  | <b>345</b> |
|---------------------|--|------------|

## LISTA DE FIGURAS

---

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 1.1</b>  | Número de publicaciones en la base de datos de Scopus de una búsqueda por el término de “screen-printed electrodes”. . . . . | 2  |
| <b>Figura 1.2</b>  | Electrodos convencionales de mercurio, pasta y carbono vítreo junto a electrodos serigrafiados desechables. . . . .          | 3  |
| <b>Figura 1.3</b>  | Diseño más típico de un electrodo serigrafiado. . . . .  | 4  |
| <b>Figura 1.4</b>  | Diferentes diseños de electrodos serigrafiados. . . . .  | 4  |
| <b>Figura 1.5</b>  | Diferentes conectores para electrodos serigrafiados. . . . .   | 5  |
| <b>Figura 1.6</b>  | Las dos configuraciones típicas de una celda electroquímica utilizando electrodos serigrafiados. . . . .                     | 5  |
| <b>Figura 1.7</b>  | Esquema de las etapas de fabricación de electrodos serigrafiados. .  | 11 |
| <b>Figura 1.8</b>  | Estructura laminar del grafito y sus principales componentes . . .   | 13 |
| <b>Figura 1.9</b>  | Esquema de los principales componentes de un sensor químico. . .   | 15 |
| <b>Figura 1.10</b> | Número de publicaciones de una búsqueda en <i>Scopus</i> del término “biosensor” desde 1990. . . . .                         | 16 |
| <b>Figura 1.11</b> | Ciclo de una reacción enzimática típica. . . . .   | 20 |
| <b>Figura 1.12</b> | Estructura esquematizada de la inmunoglobulina G (IgG). . . . .  | 23 |
| <b>Figura 1.13</b> | Métodos de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie de un transductor. . . . .            | 25 |
| <b>Figura 1.14</b> | Formatos de inmunosensores más utilizados. . . . .   | 30 |
| <b>Figura 1.15</b> | Preconcentración de plata sobre la superficie electródica tras una reacción enzimática de la fosfatasa alcalina. . . . .     | 36 |
| <b>Figura 1.16</b> | Principales tipos de detección electroquímica de nanopartículas funcionando como marca. . . . .                              | 39 |
| <b>Figura 1.17</b> | Esquema simplificado de la multidetección electroquímica de dos nanopartículas diferentes. . . . .                           | 39 |
| <b>Figura 1.18</b> | Diferentes formas de funcionalización de nanopartículas con especies biológicas. . . . .                                     | 41 |
| <b>Figura 1.19</b> | Estructura de la biotina. . . . .  | 42 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figura 1.20</b> | Estructura tridimensional de la estreptavidina unida a la biotina. Estructura obtenida del <i>RCSB Protein Data Bank</i> y representada con el software iMol. . . . . | 43 |
| <b>Figura 1.21</b> | Esquema del típico ensayo ELISA utilizado para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG. . . . .  | 46 |
| <b>Figura 1.22</b> | Esquema de las dos posibles estrategias de nanoestructuración: <i>bottom-up</i> y <i>top-down</i> . . . . .   | 48 |
| <b>Figura 1.23</b> | Esquema de la nucleación y crecimiento de nanopartículas por electrodeposición siguiendo el modelo de nucleación progresiva. . . . .                                  | 54 |
| <b>Figura 1.24</b> | Perfiles de difusión generados alrededor de un conjunto aleatorio de nanopartículas en una superficie electródica. . . . .  | 55 |
| <b>Figura 1.25</b> | Esquema de la nucleación y crecimiento de nanopartículas por electrodeposición siguiendo el modelo de nucleación instantánea. . . . .                                 | 55 |
| <b>Figura 1.26</b> | Perfil de energías para una reacción de un solo paso sin catalizar y catalizada. . . . .  | 56 |
| <b>Figura 1.27</b> | Esquema simplificado de la electrocatálisis heterogénea en la superficie electródica. . . . .   | 57 |
| <b>Figura 1.28</b> | Mecanismo de reacción enzimática de la glucosa con GOx y detección electroquímica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generado. . . . .                                 | 60 |
| <b>Figura 1.29</b> | Mecanismo de la oxidación de glucosa electrocatalizada por nanopartículas metálicas de níquel o cobre. . . . .  | 61 |
| <b>Figura 1.30</b> | Energía de las bandas de QDs de diferentes materiales y del mismo material de diferente tamaño. . . . .   | 62 |
| <b>Figura 1.31</b> | Esquema del mecanismo de las posibles transferencias electrónicas que involucran los QDs. . . . .   | 66 |
| <b>Figura 1.32</b> | Esquemas del mecanismo de las propiedades ECL y PEC de los QDs. . . . .   | 70 |
| <b>Figura 1.33</b> | Bioensayo típico realizado cuando se utilizan QDs como marca de detección electroquímica. . . . .   | 71 |
| <b>Figura 1.34</b> | Etapas típicas de una reacción electroquímica global. . . . .   | 80 |
| <b>Figura 1.35</b> | Esquema del perfil de una difusión lineal en un macroelectrodo y de una difusión radial en un microelectrodo. . . . .   | 82 |
| <b>Figura 1.36</b> | Esquema energético de la transferencia electrónica entre un electrodo y una especie redox. . . . .  | 84 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Figura 1.37</b> | Esquema de la doble capa eléctrica según el modelo de Gouy-Chapman-Stern. . . . .  | 86  |
| <b>Figura 1.38</b> | Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría cíclica.   | 87  |
| <b>Figura 1.39</b> | Perfil de concentraciones de un par redox en la interfase electrodo/disolución en función del sobrepotencial y del tiempo. . . . .                             | 88  |
| <b>Figura 1.40</b> | Curvas voltamperométricas típicas de sistema en estado estacionario. La pendiente de la curva depende de la velocidad de reacción. . . . .                     | 92  |
| <b>Figura 1.41</b> | Respuesta voltamperométrica lineal para procesos de adsorción, donde el reactivo es adsorbido (primer caso) o el producto es adsorbido (segundo caso). . . . . | 93  |
| <b>Figura 1.42</b> | Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría de pulso diferencial. . . . .  | 95  |
| <b>Figura 1.43</b> | Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría de onda cuadrada. . . . .  | 96  |
| <b>Figura 1.44</b> | Perfil de potenciales de la preconcentración mediante deposición y respuesta voltamperométrica obtenida para una mezcla de dos especies. . . . .               | 98  |
| <b>Figura 1.45</b> | Magnitud de excitación y respuesta de la cronoamperometría. . . . .  | 99  |
| <b>Figura 1.46</b> | Extracción de una respuesta lineal en una curva voltamperométrica no lineal. . . . .   | 101 |
| <b>Figura 1.47</b> | A) Evolución temporal del potencial y corriente alternos desfasados. B) Representación vectorial (del fasor) de la impedancia. . . . .                         | 103 |
| <b>Figura 1.48</b> | Representación de Nyquist de la respuesta impedimétrica. . . . .   | 104 |
| <b>Figura 1.49</b> | Circuito equivalente Randles para un sistema faradaico típico. . . . .   | 106 |
| <b>Figura 1.50</b> | Circuito equivalente para un sistema no faradaico. . . . .   | 106 |
| <b>Figura 1.51</b> | Esquema de la microscopía electroquímica de barrido. . . . .   | 107 |
| <b>Figura 1.52</b> | Contacto no efectivo del UME de la SECM en una superficie no plana. . . . .  | 109 |
| <b>Figura 1.53</b> | Esquema de una sonda de SECCM y la diferente información que puede proporcionar de un sustrato. . . . .  | 110 |
| <b>Figura 1.54</b> | Esquema de la sonda de SECCM que indica la difusión radial hacia el sustrato. . . . .  | 111 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Figura 2.1</b>  | Imagen de una tarjeta serigrafiada de 8 canales y su conector correspondiente. . . . .   | 118 |
| <b>Figura 2.2</b>  | Diagrama esquemático de la tarjeta serigrafiada de 8 canales. . . . .  | 118 |
| <b>Figura 2.3</b>  | Imagen SEM del extremo de la sonda utilizada para los experimentos de SECCM. . . . .   | 120 |
| <b>Figura 2.4</b>  | Esquema representando el <i>hopping-mode</i> utilizado con la técnica SECCM durante este trabajo. . . . .  | 120 |
| <b>Figura 2.5</b>  | Imagen y esquema del electrodo de referencia de Ag/AgCl. . . . .   | 121 |
| <b>Figura 2.6</b>  | Esquema de la síntesis organometálica de quantum dots de CdSe y CdSe/ZnS. . . . .  | 127 |
| <b>Figura 2.7</b>  | Funcionalización de los quantum dots con un polímero anfifílico. . . . .   | 128 |
| <b>Figura 2.8</b>  | Esquema del sistema utilizado para la electrodeposición en rejillas de TEM. . . . .  | 129 |
| <b>Figura 2.9</b>  | Curva cronoamperométrica obtenida para la electrodeposición metálica y representación del sistema modelo de Scharifker-Hills. . . . .  | 130 |
| <b>Figura 2.10</b> | Esquema del sistema utilizado para la transferencia de la disolución en atmósfera inerte. . . . .  | 133 |
| <b>Figura 2.11</b> | Producto obtenido en la síntesis de las TiPNPs. . . . .  | 134 |
| <b>Figura 2.12</b> | Posible mecanismo del intercambio catiónico de las TiPNPs. . . . .   | 134 |
| <b>Figura 2.13</b> | Posible esquema de la reacción covalente entre los grupos fosfato de las TiPNPs y una proteína. . . . .  | 135 |
| <b>Figura 2.14</b> | Posible esquema de la unión de la proteína con las TiPNPs tras su atrapamiento polimérico. . . . .   | 136 |
| <b>Figura 2.15</b> | Circuito equivalente empleado para ajustar los datos de EIS. . . . .   | 138 |
| <b>Figura 3.1</b>  | Voltamperogramas cíclicos para la reducción de 250 $\mu\text{M}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en la macroescala (a) y en una configuración SECCM (b). La zona específica de la superficie electródica en la cual se obtuvo esta medida se muestra en la <a href="#">Figura 3.2</a> . . . . .   | 142 |
| <b>Figura 3.2</b>  | Mapa que representa la diferencia de potenciales de pico (como $ E_{3/4}-E_{1/2} $ ) (a), mapa que representa la relación entre la corriente y la corriente límite para la reducción de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ a -0.31 V (b), imagen SEM de la misma zona (c) y mapa Raman de la relación entre $I_G/I_D$ para la zona escaneada (d). . . . . | 144 |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Figura 3.3</b>  | Espectros de Raman representativos de la superficie de electrodos serigrafiados de carbono. . . . .   | 145 |
| <b>Figura 3.4</b>  | Esquema del posible mecanismo de polimerización de dopamina tras su electro-oxidación. . . . .  | 147 |
| <b>Figura 3.5</b>  | Voltamperogramas cíclicos de dopamina en la macroescala a diferentes condiciones: a) 30 $\mu\text{M}$ y 100 $\text{mV/s}$ y b) 500 $\mu\text{M}$ y 500 $\text{mV s}^{-1}$ . . . . .   | 148 |
| <b>Figura 3.6</b>  | Voltamperogramas cíclicos consecutivos en la macroescala para la oxidación de 30 $\mu\text{M}$ de DA a 500 $\text{mV s}^{-1}$ (a) y 500 $\mu\text{M}$ de DA a 100 $\text{mV s}^{-1}$ (b). Dos voltamperogramas cíclicos típicos obtenidos con SECCM para la oxidación de 30 $\mu\text{M}$ de DA a 500 $\text{mV s}^{-1}$ (c-d). El área específica donde estos voltamperogramas son obtenidos se indican en la <a href="#">Figura 3.8</a> . . . . . | 149 |
| <b>Figura 3.7</b>  | Imagen SEM de una zona escaneada de un electrodo serigrafiados y su correspondiente imagen topográfica obtenida con SECCM. . . . .  | 152 |
| <b>Figura 3.8</b>  | Mapas que representan la oxidación de 30 $\mu\text{M}$ de DA a 500 $\text{mV s}^{-1}$ en una configuración SECCM: a) relación entre la corriente de pico y la corriente límite, b) potencial de semionda. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación $I_G/I_D$ para la misma zona escaneada. . . . .  | 152 |
| <b>Figura 3.9</b>  | a) Voltamperogramas cíclicos consecutivos para un experimento SECCM en una zona específica de la superficie electródica, y b) mapa representando la relación entre la corriente de pico del primer y del quinto voltamperograma. . . . .  | 153 |
| <b>Figura 3.10</b> | a) Dos voltamperogramas típicos obtenidos para la oxidación de 1 $\mu\text{M}$ de DA en configuración SECCM. b) Mapa representando la concentración superficial a lo largo de la superficie serigrafiada. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación $I_G/I_D$ para la zona barrida. La imagen SEM muestra las zonas específicas de los voltamperogramas en a). . . . .   | 154 |
| <b>Figura 3.11</b> | Mapa representando el potencial de semionda (a) y la diferencia de potenciales de pico (b) para la oxidación de 500 $\mu\text{M}$ de DA a 500 $\text{mV s}^{-1}$ en una configuración SECCM. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación $I_G/I_D$ de la zona barrida. . . . .   | 156 |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Figura 3.12</b> | Imagen SEM de la zona escaneada en un experimento SECCM para la oxidación de 500 $\mu\text{M}$ de DA a una velocidad de barrido de 100 $\text{mV s}^{-1}$ (a) y de 500 $\text{mV s}^{-1}$ (b). . . . .  | 157 |
| <b>Figura 3.13</b> | a) CVs consecutivas en un experimento SECCM para la oxidación de 500 $\mu\text{M}$ de DA a 500 $\text{mV s}^{-1}$ . b) Imagen SEM de la zona barrida y c) mapa que representa la disminución de la corriente de pico entre la primera y la quinta CV en la superficie electródica. . . . .  | 157 |
| <b>Figura 4.1</b>  | Espectro de emisión de fluorescencia en $\text{CHCl}_3$ para los diferentes quantum dots CdSe sintetizados (ver <a href="#">Tabla 4.1</a> ). Síntesis 1, línea continua; Síntesis 2, línea de puntos; Síntesis 3, línea discontinua; Síntesis 4, línea de puntos y guiones . . . . .  | 164 |
| <b>Figura 4.2</b>  | Espectro de emisión de fluorescencia de los quantum dots de Cd-Se/ZnS en medio acuoso. . . . .  | 165 |
| <b>Figura 4.3</b>  | Esquema del procedimiento de medida para los QDs de CdSe en medio orgánico. . . . .   | 166 |
| <b>Figura 4.4</b>  | Esquema del procedimiento de medida para los QDs core-shell de CdSe/ZnS en medio acuoso. . . . .  | 167 |
| <b>Figura 4.5</b>  | a) CV de una disolución de 100 $\text{mg L}^{-1}$ de Cd(II) en presencia y ausencia de 10 $\text{mg L}^{-1}$ de Bi(III), además de una disolución en ausencia de metales. b) DPV de una disolución de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) en presencia y ausencia de 10 $\text{mg L}^{-1}$ de Bi(III) y DPV de Cd y Bi . . . . .                             | 168 |
| <b>Figura 4.6</b>  | a) Efecto de la concentración de Bi(III) en la corriente de pico DPV para una disolución de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II), y b) efecto de un potencial de activación justo antes de realizar la medida. . . . .  | 169 |
| <b>Figura 4.7</b>  | Imagen SEM del electrodo de trabajo serigrafiado antes (a) y después (b) de la etapa de deposición. . . . .   | 170 |
| <b>Figura 4.8</b>  | Esquema del mecanismo de competición entre la generación de $\text{H}_2$ y la deposición metálica. . . . .  | 172 |
| <b>Figura 4.9</b>  | Recta de calibrado representando la señal del Cd(II) frente a la concentración de QDs de CdSe en medio orgánico para 3, 6, 15, 30, 60, 120 ( $\times 10^{12}$ ) QDs $\text{ml}^{-1}$ . ( <i>Inset</i> : voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos para estas medidas. Condiciones experimentales descritas en <a href="#">Sección 4.2.2</a> . . . . . | 174 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Figura 4.10</b> | Recta de calibrado representando la señal de Cd(II) frente a la concentración de QDs de CdSe/ZnS en medio acuoso para 6, 12, 18, 24, 30 ( $\times 10^{12}$ ) QDs $\text{ml}^{-1}$ . <i>Inset</i> : voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos para estas medidas. Condiciones experimentales descritas en <a href="#">Sección 4.2.2</a> . . . . .   | 174 |
| <b>Figura 4.11</b> | Relación entre la señal de Cd(II) frente al volumen de QDs de CdSe de diferentes tamaños (2.77, 2.98, 3.14 y 3.26 nm). . . . .   | 176 |
| <b>Figura 5.1</b>  | Esquema del procedimiento del biosensor para la detección de QDs-BT utilizado para la optimización. . . . .  | 182 |
| <b>Figura 5.2</b>  | Esquema del procedimiento del biosensor competitivo para la detección de biotina usando QDs como marca y su detección <i>in situ</i> . . . . .   | 182 |
| <b>Figura 5.3</b>  | Voltamperogramas de pulso diferencial para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de $\text{Cd}^{2+}$ y $1 \text{ mg L}^{-1}$ de Bi(III) en una disolución reguladora de acetato (0.1 M y pH 4.5) usando electrodos modificados con diferentes nanomateriales: (negro) electrodos sin modificar, (rojo) nanotubos de carbono, (verde) óxido de grafeno, y (azul) nanofibras de carbono. . . . .  | 184 |
| <b>Figura 5.4</b>  | Voltamperogramas de pulso diferencial para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of $\text{Cd}^{2+}$ en disolución regulador de acetato (0.1 M y pH 4.5) usando diferentes películas metálicas: (negro) $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ de Bi(III), (rojo) $5 \text{ mg L}^{-1}$ de Sb(III), y (azul) $10 \text{ mg L}^{-1}$ de Bi(III) y $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ de Sb(III). <i>Inset</i> : corrientes de pico medias ( $n=3$ ) para cada película metálica utilizada. . . . .           | 185 |
| <b>Figura 5.5</b>  | Voltamperogramas de pulso diferencial para una disolución de 1 nM QDs en reguladora de acetato (0.1 M y pH 4.5): (verde) tras la adición de HCl 1 M y aplicar un potencial de activación de +1.00 V durante 60 s, (azul) tras la adición de HCl 1 M pero sin aplicar el potencial de activación, (negro) sin añadir HCl y sin aplicar el potencial de activación, y (rojo) sin añadir HCl pero aplicando un potencial de activación de +1.00 V durante 60 s. . . . . | 187 |
| <b>Figura 5.6</b>  | Efecto del potencial de activación en la corriente de pico voltamperométrica. . . . .  | 187 |
| <b>Figura 5.7</b>  | Efecto de la concentración de estreptavidina en la respuesta analítica del biosensor. . . . .  | 190 |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Figura 5.8</b> | Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el biosensor multicanal en presencia de diferentes concentraciones de BT-QDs (a)-(f): 1, 2, 4, 7, 10 y 12 $\times 10^{-9}$ M. <i>Inset</i> : recta de calibrado para el biosensor en función de la concentración de BT-QDs. Las condiciones experimentales fueron las optimizadas en el trabajo. . . . . | 192 |
| <b>Figura 5.9</b> | Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el biosensor multicanal registrados para el ensayo competitivo en presencia de concentraciones crecientes de biotina: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 $\times 10^{-9}$ M. <i>Inset</i> : recta semilogarítmica de la correspondiente curva de calibrado. . . . .   | 193 |
| <b>Figura 6.1</b> | Esquema del procedimiento del biosensor para la detección de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa. . . . .  | 198 |
| <b>Figura 6.2</b> | Esquema del inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG con el bioensayo de varias etapas. . . . .   | 199 |
| <b>Figura 6.3</b> | Esquema del inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG con el bioensayo de una sola etapa. . . . .  | 200 |
| <b>Figura 6.4</b> | <b>A)</b> Voltamperometría de pulso diferencial de la señal analítica para los sueros positivo y negativo utilizando el inmunosensor electroquímico sin optimizar. <b>B)</b> Voltamperogramas de pulso diferencial de la señal analítica para los sueros positivo y negativo tras la optimización del inmunosensor electroquímico. . . . .                               | 201 |
| <b>Figura 6.5</b> | <b>A)</b> Respuesta lineal del sensor para los diferentes calibradores del kit ELISA comercial frente a diferentes concentraciones de anticuerpo IgG anti-tTG (0, 7, 16 and 40 U mL <sup>-1</sup> ). <b>B)</b> Voltamperogramas de pulso diferencial para los mismos calibradores del kit ELISA usando el inmunosensor electroquímico. . . . .                           | 203 |
| <b>Figura 6.6</b> | Estudio de estabilidad para el inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgG anti-tTG. . . . .  | 204 |
| <b>Figura 6.7</b> | Fotografía de gotas de una disolución de tTG usando el procedimiento de modificación convencional (arriba) y la modificación hidrofílica desarrollada en este trabajo (abajo). . . . .   | 206 |

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>Figura 6.8</b>  | Gráficas Nyquist para medidas EIS de un SPCE sin modificar (negro), SPCE tras la modificación convencional con tTG (rojo) y SPCE tras la modificación con tTG desarrollada en este trabajo (azul). 206  |
| <b>Figura 6.9</b>  | Voltamperometría de pulso diferencia de la señal analítica para los controles séricos positivo (rojo) y negativo (negro) usando el sensor electroquímico con una etapa de bloqueo (A), sin etapa de bloqueo y sin BSA (B) y sin etapa de bloqueo pero con BSA en la disolución de anti-H-IgA-BT (C). D) DPV para un control sérico negativo (rojo) y para un control sérico positivo usando HRP como elemento sensor (negro). . . . . 208 |
| <b>Figura 6.10</b> | Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el inmunosensor desarrollado siguiendo el procedimiento por etapas (0, 3, 7, 16, 40, 100 U mL <sup>-1</sup> para la concentración de IgA anti-tTG). . . . . 209   |
| <b>Figura 6.11</b> | Recta de calibrado para la concentración de anticuerpos IgG anti-tTG con la etapa de bloqueo (línea de puntos) y llevado a cabo con la metodología sin etapa de bloqueo (línea discontinua). . . . 210  |
| <b>Figura 6.12</b> | Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el inmunosensor desarrollado siguiendo el bioensayo de una etapa (0, 3, 7, 16, 40 U mL <sup>-1</sup> para la concentración de IgA anti-tTG). 212  |
| <b>Figura 6.13</b> | Estudio de estabilidad del inmunosensor electroquímico siguiendo el bioensayo de una sola etapa para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG. . . . . 213  |
| <b>Figura 7.1</b>  | Voltamperometría cíclica de plata en un SPCE modificado con QDs (línea azul), en un SPCE sin modificar (línea roja) y CV de NH <sub>3</sub> en un SPCE modificado con QDs (línea negra). . . . . 220  |
| <b>Figura 7.2</b>  | a) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.3 a -0.55 V para NH <sub>3</sub> en un SPCE modificado con QDs (rojo), 250 μM de plata en un SPCE (azul) y 250 μM de plata en un SPCE modificado con QDs (negro). b) Voltamperometría de barrido lineal desde -0.1 a +0.7 V de las mismas disoluciones tras la electrodeposición aplicando -0.2 V durante 60 s. . . . . 220  |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Figura 7.3</b>  | A) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.25 a -0.7 V de 250 $\mu\text{M}$ de plata a diferentes velocidades de barrido (10, 25, 50, 100 $\text{mV s}^{-1}$ ) para SPCEs modificados con QDs. B) Relación entre la corriente de pico del proceso a -0.05 V y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. C) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.2 a +0.7 V de 50 $\mu\text{M}$ de plata a diferentes velocidades de barrido (10, 25, 50, 100 $\text{mV s}^{-1}$ ) para SPCEs modificados con QDs tras la electrodeposición aplicando -0.1 V durante 60 s. D) Relación entre la corriente de pico del proceso a +0.45 V y la velocidad de barrido. . . . . | 221 |
| <b>Figura 7.4</b>  | Voltamperometría de barrido lineal entre -0.1 y +0.7 V de 50 $\mu\text{M}$ de plata tras la electrodeposición aplicando -0.1 V durante diferentes tiempos (30, 60, 120, 300 s) en electrodos modificados con QDs. . . . .   | 223 |
| <b>Figura 7.5</b>  | Imágenes de microscopía confocal de electrodos serigrafiados modificados con QDs en diferentes condiciones de electrodeposición de plata (-0.1 V): a) sin electrodepositar, b) durante 5 s, c) durante 15 s, d) durante 30s. . . . .  | 223 |
| <b>Figura 7.6</b>  | Imagen TEM de los QDs utilizados en este trabajo (a), y (b) de QDs tras la electrodeposición de plata en la rejilla de TEM. . . . .   | 225 |
| <b>Figura 7.7</b>  | Imagen de TEM de QDs (a) y Ag@QDs (b) a una menor magnificación. . . . .  | 225 |
| <b>Figura 7.8</b>  | Perfil de STEM y EDX obtenidos para las Ag@QDs generadas tras la electrodeposición de plata sobre la rejilla de TEM. . . . .  | 226 |
| <b>Figura 7.9</b>  | Posible esquema de la electrodeposición de plata en un electrodo modificado con QDs a diferentes tiempos de deposición. . . . .   | 227 |
| <b>Figura 7.10</b> | Respuesta voltamperométrica de Co(II), Ni(II) y Cu(II) en electrodos modificados con QDs y sin modificar. . . . .   | 228 |
| <b>Figura 7.11</b> | Imágenes SEM para a) SPCEs sin modificar y b) SPCEs modificados con QDs tras la electrodeposición de plata bajo las mismas condiciones experimentales . . . . .   | 229 |
| <b>Figura 7.12</b> | Respuesta i-t transitorias del modelo Scharifker-Hills para la electrodeposición de plata en a) SPCEs sin modificar y b) SPCEs modificados con QDs. . . . .   | 230 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Figura 7.13</b> | a) Imagen SEM de un SPCE parcialmente modificado con diferentes gotas de una disolución de QDs y tras la electrodeposición con plata. En esta figura se muestra el borde de una gota para visualizar la interfase entre la superficie de carbono modificada con QDs y sin modificar. b) Imagen SEM del mismo electrodo a una magnificación más baja. . . . . | 232 |
| <b>Figura 7.14</b> | a) Respuesta voltamperométrica de redisolución de para SPCEs modificados con diferentes concentraciones de QDs (0, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 25 nM). b) Recta de calibrado representando la corriente de pico frente a la concentración de QDs para las mismas concentraciones. . . . .   | 233 |
| <b>Figura 8.1</b>  | Imágenes de TEM de TiPNPs (a) y de CuTiPNPs (b). . . . .   | 242 |
| <b>Figura 8.2</b>  | Voltamperometrías cíclicas de las diferentes MTiPNPs sintetizadas. . . . .   | 244 |
| <b>Figura 8.3</b>  | Efecto del medio electrolítico en la corriente de pico de redisolución para todas las MTiPNPs. . . . .   | 246 |
| <b>Figura 8.4</b>  | Espectro IR para TiPNPs, CdTiPNPs y CuTiPNPs tras el contacto con una disolución de HCl 0.1 M durante 60 s. . . . .  | 247 |
| <b>Figura 8.5</b>  | Efecto del medio electrolítico en el potencial de pico de redisolución para todas las MTiPNPs. . . . .   | 247 |
| <b>Figura 8.6</b>  | Voltamperogramas de onda cuadrada para CdTiPNPs sintetizados usando una sal de nitrato (rojo) y una sal de acetato (negro). . . . .  | 250 |
| <b>Figura 8.7</b>  | Efecto del tiempo de almacenamiento en la respuesta voltamperométrica de CdTiPNPs y AgTiPNPs tras su almacenamiento sólido. . . . .  | 252 |
| <b>Figura 8.8</b>  | Efecto del tiempo de almacenamiento en la respuesta voltamperométrica de CdTiPNPs tras su almacenamiento en disolución. . . . .  | 253 |
| <b>Figura 8.9</b>  | Respuesta voltamperométrica de 1 mg mL <sup>-1</sup> y 2 mg mL <sup>-1</sup> de Cd-TiPNPs, de Cd(II) en disolución y del electrolito de fondo utilizado. . . . .   | 254 |
| <b>Figura 8.10</b> | Respuesta DPV para diferentes concentraciones de CdTiPNPs tras la electrodeposición durante 30 s y sin la electrodeposición. . . . .   | 255 |
| <b>Figura 8.11</b> | Respuesta DPV para concentraciones crecientes de CdTiPNPs y curva de calibrado asociada. . . . .   | 256 |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Figura 8.12</b> | CVs para diferentes concentraciones de AgTiPNPs (0, 0.2, 2 y 20 mg mL <sup>-1</sup> ) en KI 0.1. . . . .  | 257 |
| <b>Figura 8.13</b> | A) Respuesta de diferentes técnicas voltamperométricas (LSV, DPV y SWV) para 0.5 mg mL <sup>-1</sup> de AgTiPNPs tras la deposición de palta durante 30 s a -0.3 V. B) Relación entre señal/blanco de 25 µg mL <sup>-1</sup> de AgTiPNPs en diferentes medios electrolíticos, usando SWV con un potencial de deposición de -0.3 V durante 30 s. . . . . | 258 |
| <b>Figura 8.14</b> | a) Voltamperogramas SWV para 0, 0.5, 1, 10 y 100 µg mL <sup>-1</sup> de AgTiPNPs. b) Recta de calibrado representando la corriente de pico frente a la concentración de AgTiPNPs. . . . .   | 258 |
| <b>Figura 8.15</b> | CVs de 5 mM de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup> en electrodos modificados con CuTiPNPs y sin modificar. Relación entre la corriente de pico anódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. . . . .  | 260 |
| <b>Figura 8.16</b> | Representación Nyquist de la respuesta impedimétrica obtenida para electrodos modificados con CuTiPNPs y sin modificar para [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> (a) y en electrodos modificados con TiPNPs y sin modificar para [Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>2+/3+</sup> . . . . .   | 261 |
| <b>Figura 8.17</b> | Voltamperogramas SWV para mezclas binarias de las diferentes MTiPNPs. . . . .   | 263 |
| <b>Figura 8.18</b> | Voltamperogramas SWV para disoluciones individuales de MTiPNPs. . . . .   | 264 |
| <b>Figura 8.19</b> | Imagen de las disoluciones generadas tras poner en contacto H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> y NaBH <sub>4</sub> en ausencia y presencia de TiPNPs. Imagen SEM del material híbrido obtenido AuNPs/TiPNPs. . . . .  | 265 |
| <b>Figura 8.20</b> | Efecto del potencial de deposición en la respuesta voltamperométrica de una mezcla de CuTiPNPs y HgTiPNPs. . . . .  | 266 |
| <b>Figura 8.21</b> | Respuesta voltamperométrica para concentraciones crecientes de CuTiPNPs y HgTiPNPs y rectas de calibrado asociadas a cada respuesta. . . . .  | 267 |
| <b>Figura 9.1</b>  | Esquema del biosensor competitivo para la detección de biotina usando CdTiPNPs como marca. . . . .  | 272 |
| <b>Figura 9.2</b>  | Esquema del biosensor multianalito para la detección de anti-tTG IgA e IgG usando HgTiPNPs y CuTiPNPs como marca. . . . .   | 273 |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Figura 9.3</b>  | Distribución de tamaños y potencial $\zeta$ para las CdTiPNPs antes (rojo) y después (negro) de la funcionalización con neutravidina mediante el atrapamiento polimérico. . . . . | 275 |
| <b>Figura 9.4</b>  | Espectro IR de CdTiPNPs sin modificar, modificadas con albúmina y modificadas con albúmina tras su intercambio con $\text{NH}_4^+$ . . .  | 277 |
| <b>Figura 9.5</b>  | Posible interacción mixta entre electrostática y covalente de la proteína con las TiPNPs. . . . .   | 277 |
| <b>Figura 9.6</b>  | Respuesta SWV para el biosensor con CdTiPNPs-NTV como marca en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de Alb-BT (negra). . .  | 279 |
| <b>Figura 9.7</b>  | Respuesta SWV del biosensor de afinidad para diferentes concentraciones de CdTiPNPs-NTV y recta de calibrado asociada. . . . .  | 279 |
| <b>Figura 9.8</b>  | Respuesta SWV del biosensor competitivo para diferentes concentraciones de biotina y recta de calibrado logarítmica asociada. . . .   | 280 |
| <b>Figura 9.9</b>  | Efecto de la concentración de anticuerpo (IgA-BT, IgG-BT) en la reacción de afinidad con MTiPNPs-NTV en la corriente de pico del biosensor. . . . .                               | 282 |
| <b>Figura 9.10</b> | Efecto de la temperatura de reacción de la etapa con el anticuerpo marcado en las corrientes de los picos voltamperométricos para un control positivo y negativo. . . . .         | 283 |
| <b>Figura 9.11</b> | Respuesta SWV obtenida para diferentes concentraciones de los biomarcadores y rectas de calibrado asociadas. . . . .  | 284 |
| <b>Figura 9.12</b> | Respuesta SWV para una mezcla de biomarcadores (negro), en ausencia de anti-tTG IgA (verde), en ausencia de anti-tTG IgG (rojo) y en ausencia de ambos analitos (azul). . . . .   | 286 |
| <b>Figura 10.1</b> | Voltamperometría cíclica para diferentes cantidades de AgTiPNPs (0, 2 y 20 $\text{mg mL}^{-1}$ ) y 200 $\text{mg mL}^{-1}$ de TiPNPs en HCl 1 M. . . . .                          | 291 |
| <b>Figura 10.2</b> | Esquema de la HER catalizada por AgTiPNPs y sin catalizar. . . .  | 291 |
| <b>Figura 10.3</b> | Imágenes de SEM de un electrodo serigrafiado modificado con AgTiPNPs (a) y modificados con AgTiPNPs tras su reducción (b). . .  | 291 |
| <b>Figura 10.4</b> | Imagen de TEM de las AgTiPNPs. . . . .  | 292 |
| <b>Figura 10.5</b> | Gráfica de Nyquist para SPCEs sin modificar (rojo), modificados con TiPNPs (negro), modificados con AgTiPNPs (azul) y modificados con AgTiPNPs reducidas (verde). . . . .         | 292 |

|                     |  |     |
|---------------------|--|-----|
| <b>Figura 10.6</b>  | Corrientes cronoamperométricas obtenidas a diferentes potenciales de reducción en presencia y ausencia (blanco) de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgTiPNPs en HCl 0.1. . . . .   | 293 |
| <b>Figura 10.7</b>  | a) Curvas cronoamperométricas para 0.001, 0.01, 0.1, 2 y 10 $\text{mg mL}^{-1}$ de AgTiPNPs en HCl 1 M tras la aplicación de un potencial constante de -1.2 V. b) Recta de calibrado representando la señal analítica frente al logaritmo de la cantidad (en $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de AgTiPNPs para las medidas cronoamperométricas a 150 s. . . . . | 294 |
| <b>Figura 10.8</b>  | CVs para electrodos modificados con AgTiPNPs y sin modificar, en presencia y ausencia de 50 mM de $\text{H}_2\text{O}_2$ . . . . .   | 295 |
| <b>Figura 10.9</b>  | Esquema de la reacción catalítica de reducción de $\text{H}_2\text{O}_2$ en electrodos modificados con AgTiPNPs y sin modificar. . . . .   | 296 |
| <b>Figura 10.10</b> | Efecto del potencial de detección en la respuesta cronoamperométrica de la reducción de $\text{H}_2\text{O}_2$ utilizando electrodos modificados con AgTiPNPs. . . . .   | 296 |
| <b>Figura 10.11</b> | Respuesta cronoamperométrica para diferentes concentraciones de $\text{H}_2\text{O}_2$ y recta de calibrado asociada. . . . .  | 297 |
| <b>Figura 10.12</b> | Esquema del mecanismo enzimático de oxidación de glucosa por GOx y reducción catalizada de $\text{H}_2\text{O}_2$ en presencia de AgTiPNPs. . . . .  | 298 |
| <b>Figura 10.13</b> | Respuesta cronoamperométrica a diferentes concentraciones de glucosa y recta de calibrado asociado. . . . .  | 298 |
| <b>Figura 10.14</b> | Respuesta LSV de SPCEs modificados con CuTiPNPs y sin modificar, en presencia y ausencia de glucosa. . . . .   | 300 |
| <b>Figura 10.15</b> | Espectro IR de TiPNPs, CuTiPNPs y CuTiPNPs tras su colocación en una disolución de NaOH 0.1 M durante 60 s. . . . .  | 301 |
| <b>Figura 10.16</b> | Imágenes de TEM de las TiPNPs, CuTiPNPs y CuTiPNPs tras su colocación en la disolución de NaOH 0.1 M. . . . .  | 302 |
| <b>Figura 10.17</b> | Espectro de XPS de CuTiPNPs y de CuTiPNPs tras su colocación en la disolución de NaOH 0.1 M. . . . .   | 302 |
| <b>Figura 10.18</b> | Esquema general de la oxidación catalítica de glucosa en presencia de CuTiPNPs. . . . .  | 303 |
| <b>Figura 10.19</b> | Mecanismo general propuesto para la formación de la especie de Cu(III) en las CuTiPNPs. . . . .  | 304 |

---

|                     |   |     |
|---------------------|---|-----|
| <b>Figura 10.20</b> | Respuesta LSV para diferentes velocidades de barrido de electrodos modificados con CuTiPNPs en presencia de 10 mM de glucosa. Respuesta lineal obtenida entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. . . . . | 305 |
| <b>Figura 10.21</b> | Efecto de la concentración de CuTiPNPs en la respuesta cronopotentiométrica en presencia y ausencia de 1 mM de glucosa. . . . .   | 307 |
| <b>Figura 10.22</b> | Efecto del potencial de deposición en la respuesta cronopotentiométrica en presencia y ausencia de 0.5 mM de glucosa. . . . .   | 307 |
| <b>Figura 10.23</b> | Respuesta cronopotentiométrica obtenida para concentraciones crecientes de glucosa y recta de calibrado asociada. . . . .   | 308 |
| <b>Figura 10.24</b> | Estudio de estabilidad del detector nanoestructurado tras diferentes tiempos de almacenamiento. . . . .   | 310 |
| <b>Figura 10.25</b> | Respuesta interferente del detector hacia otras especies como DA, UA y AA (a) y hacia otros azúcares diferentes de glucosa (b). . . . .   | 311 |
| <b>Figura A.1</b>   | Celdas electroquímicas de dos y tres electrodos. . . . .  | 334 |
| <b>Figura A.2</b>   | Respuesta i-E de un electrodo polarizable y no polarizable ideal. . . . .   | 336 |
| <b>Figura B.1</b>   | Interacción del haz electrónico con la muestra y las diferentes respuestas producidas en función de la distancia de penetración del haz. . . . .  | 340 |



## LISTA DE TABLAS

---

|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| <b>Tabla 2.2</b> | Reactivos comunes utilizados durante esta Tesis Doctoral . . . . .   | 123 |
| <b>Tabla 4.1</b> | Diámetro, concentración y longitud de onda del máximo de emisión de los quantum dots sintetizados de CdSe y CdSe/ZnS. . . . .                  | 164 |
| <b>Tabla 4.2</b> | Cantidad de bismuto depositada en la superficie electródica para diferentes condiciones de deposición. . . . .                                 | 170 |
| <b>Tabla 4.3</b> | Factores optimizados para la detección de QDs en medio acuoso. En negrita los parámetros más adecuados. . . . .                                | 172 |
| <b>Tabla 5.1</b> | Características analíticas de otros ensayos electroquímicos competitivos para la detección de biotina. . . . .                                 | 193 |
| <b>Tabla 6.1</b> | Valores clave de concentraciones de anti-tTG IgG para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. . . . .   | 203 |
| <b>Tabla 6.2</b> | Valores clave de la concentración de IgA anti-tTG para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. . . . .  | 210 |
| <b>Tabla 7.1</b> | Densidad de población de núcleos estimada para la electrodeposición de plata a -0.2 V para SPCEs sin modificar y modificados con QDs . . . . . | 230 |
| <b>Tabla 7.2</b> | Características analíticas de varias metodologías de detección electroquímica de QDs usando electrodos serigrafiados. . . . .                  | 234 |
| <b>Tabla 8.1</b> | Cantidad estimada de metal introducido en las MTiPNPs. . . . .   | 249 |
| <b>Tabla 8.2</b> | Parámetros optimizados para la detección electroquímica de Ag-TiPNPs. . . . .  | 258 |
| <b>Tabla 8.3</b> | Tamaños de las nanopartículas obtenidas en el proceso mediante medidas por DLS. . . . .  | 265 |
| <b>Tabla 9.1</b> | Condiciones experimentales optimizadas para la detección electroquímica de las CdTiPNPs. . . . .   | 271 |
| <b>Tabla 9.2</b> | Condiciones experimentales para la detección electroquímica de la mezcla CuTiPNPs y HgTiPNPs. . . . .  | 273 |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
| <b>Tabla 10.1</b> | Características analíticas de varios detectores de glucosa no enzimáticos usando electrodos serigrafiados. . . . . | 309 |
|-------------------|--|-----|

# NOMENCLATURA

---

|              |  |
|--------------|--|
| $\alpha$     | Coeficiente de transferencia electrónica           |
| $\Delta E_p$ | Diferencia de potenciales de pico                  |
| $\Delta G$   | Energía libre de Gibbs                             |
| $\eta$       | Sobrepotencial                                     |
| $\Gamma^*$   | Concentración superficial de una especie adsorbida |
| $C_{dl}$     | Capacitancia de la doble capa eléctrica            |
| $E_F$        | Nivel de Fermi                                     |
| $E_p$        | Potencial de pico                                  |
| $E_{1/2}$    | Potencial de semionda                              |
| $E_{eq}$     | Potencial de equilibrio                            |
| $E_{pa}$     | Potencial de pico anódico                          |
| $E_{pc}$     | Potencial de pico catódico                         |
| $E$          | Potencial estándar                                 |
| $E'$         | Potencial formal                                   |
| $i_0$        | Corriente de intercambio                           |
| $i_c$        | Corriente capacitiva                               |
| $i_p$        | Corriente de pico                                  |
| $i_{lim}$    | Corriente límite de estado estacionario            |
| $i_{pa}$     | Corriente de pico anódico                          |

|              |  |
|--------------|--|
| $i_{pc}$     | Corriente de pico catódico                                 |
| $i_{qss}$    | Corriente de estado quasi-estacionario                     |
| $K_a$        | Constante de afinidad                                      |
| $K_d$        | Constante de disociación                                   |
| $R_s$        | Resistencia de la disolución                               |
| $R_{ct}$     | Resistencia a la transferencia de carga                    |
| 8xSPCEs      | Tarjetas serigrafiadas de 8 canales                        |
| A            | Área electródica   |
| ADN          | Ácido desoxirribonucleico                                  |
| AgNPs        | Nanopartículas de plata                                    |
| AgTiPNPs     | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata |
| Alb-BT       | Albúmina biotilada   |
| anti-IgA-BT  | Anticuerpo anti-IgA marcado con biotina                    |
| anti-IgG-BT  | Anticuerpo anti-IgG marcado con biotina                    |
| anti-IgG-QD  | Conjugado quantum dots - anti-IgG                          |
| anti-tTG IgA | Anticuerpos IgA anti-transglutaminasa                      |
| anti-tTG IgG | Anticuerpos IgG anti-transglutaminasa                      |
| AOT          | Docusato de sodio  |
| AP           | Fosfatasa alcalina   |
| ARN          | Ácido ribonucleico   |
| ASV          | Voltamperometría de redisolución anódica                   |
| AuNPs        | Nanopartículas de oro                                      |
| biotin-QD    | Conjugado quantum dots - biotina                           |

|          |  |
|----------|--|
| BiTiPNPs | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con bismuto |
| BSA      | Albúmina de suero bovino                                     |
| AC       | Corriente alterna  |
| CB       | Banda de conducción  |
| CdTiPNPs | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio  |
| CNTs     | Nanotubos de carbono   |
| CuTiPNPs | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre   |
| CV       | Voltamperometría cíclica                                     |
| DA       | Dopamina   |
| DAC      | Dopaminacromo  |
| DAQ      | Dopaminaquinona  |
| DLS      | Dispersión dinámica de luz                                   |
| DOS      | Densidad de estados  |
| DPV      | Voltamperometría de pulso diferencial                        |
| EC       | Enfermedad celíaca   |
| ECL      | Electroquimioluminiscencia                                   |
| EDX      | Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva              |
| EIS      | Espectroscopia de impedancia electroquímica                  |
| ELISA    | Enzyme-linked immunosorbent Assay                            |
| ET       | Transferencia electrónica                                    |
| F        | Constante de Faraday   |
| FET      | Transistor de efecto de campo                                |
| FIA      | Análisis por inyección en flujo                              |

|             |   |
|-------------|---|
| GOx         | Glucosa oxidasa   |
| HER         | Reacción de evolución del hidrógeno                           |
| HgTiPNPs    | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con mercurio |
| HOMO        | Orbital molecular ocupado de mayor energía                    |
| HOPG        | Grafito pirolítico altamente ordenado                         |
| HRP         | Peroxidasa del rábano silvestre                               |
| HRTEM       | Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución     |
| ICP-MS      | Espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo   |
| Ig          | Inmunoglobulina   |
| IR          | Espectroscopía infrarroja                                     |
| ISE         | Electrodo selectivo de iones                                  |
| IUPAC       | International Union of Pure and Applied Chemistry             |
| $k^{\circ}$ | Constante heterogénea estándar de velocidad                   |
| LDAC        | Leucodopaminacromo  |
| LOD         | Límite de detección   |
| LSV         | Voltamperometría de barrido lineal                            |
| LUMO        | Orbital molecular vacío de menor energía                      |
| MB          | Partículas magnéticas   |
| MIPs        | Polímeros molecularmente impresos                             |
| MTiPNPs     | Nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales  |
| MWCNTs      | Nanotubos de carbono de pared múltiple                        |
| NPs         | Nanopartículas  |
| NTV         | Neutravidina  |

|        |  |
|--------|--|
| ORR    | Reacción de reducción del oxígeno                            |
| PBS    | Disolución reguladora de fosfato                             |
| PBST   | Disolución reguladora de fosfato con Tween                   |
| PEC    | Fotoelectroquímica   |
| POC    | Point-of-Care  |
| PVC    | Cloruro de polivinilo  |
| Q      | Carga  |
| QCM    | Microbalanza de cristal de cuarzo                            |
| QD-STV | Conjugado quantum dots - estreptavidina                      |
| QDs    | Quantum dots   |
| QRCE   | Electrodo de quasi-referencia y auxiliar                     |
| R      | Constante universal de los gases                             |
| RMN    | Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear               |
| SECCM  | Microscopía de celda electroquímica de barrido               |
| SECM   | Microscopía electroquímica de barrido                        |
| SEM    | Microscopía electrónica de barrido                           |
| SICM   | Microscopía de conductancia iónica de barrido                |
| SPCEs  | Electrodos serigrafiados de grafito                          |
| SPEs   | Electrodos serigrafiados                                     |
| SPM    | Microscopía de sonda de barrido                              |
| SPR    | Resonancia de plasmón superficial                            |
| STEM   | Modo de barrido de la Microscopía electrónica de transmisión |
| STV    | Estreptavidina   |

|        |   |
|--------|---|
| SWCNTs | Nanotubos de carbono de pared simple      |
| SWV    | Voltamperometría de onda cuadrada         |
| T      | Temperatura                               |
| TEM    | Microscopía electrónica de transmisión    |
| TiP    | Fosfato de titanio                        |
| TiPNPs | Nanopartículas de fosfato de titanio      |
| TOP    | Trioctilfosfina                           |
| TOPO   | Óxido de trioctilfosfina                  |
| Tris   | Disolución reguladora de Trizma           |
| tTG    | Transglutaminasa tisular                  |
| UME    | Ultramicroelectrodo                       |
| UV-Vis | Ultravioleta - Visible                    |
| VB     | Banda de valencia                         |
| XPS    | Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X |
| XRD    | Difracción de rayos X                     |

# INTRODUCCIÓN

---

Esta Tesis Doctoral se basa, principalmente, en el estudio de diversas aplicaciones electroanalíticas de dos tipos de nanopartículas: quantum dots (QDs) (*Capítulos 4, 5, 6 y 7*) y nanopartículas de fosfato de titanio (TiPNPs) (*Capítulos 8, 9 y 10*) utilizando electrodos serigrafiados, cuya actividad electroquímica localizada ha sido estudiada con técnicas microscópicas como microscopía de celda electroquímica de barrido (SECCM) (*Capítulo 3*). Por tanto, la introducción comienza describiendo los **electrodos serigrafiados** (SPEs) como herramienta electródica, su forma de fabricación, aplicaciones y sus características electroquímicas. A continuación, se describen los diferentes tipos de **biosensores**, haciendo especial hincapié en los biosensores con transducción electroquímica y sus marcas de detección, aplicaciones muy relevantes de las nanopartículas estudiadas en este trabajo. La **nanotecnología** también juega un papel fundamental en esta Tesis Doctoral, por lo que sus principales características con un enfoque electroquímico son descritas. La electrodeposición de nanopartículas metálicas y la electrocatálisis usando nanopartículas son dos temas muy interesantes que entran dentro de este apartado. Posteriormente, las principales características, aplicaciones y comportamiento electroquímico de los QDs y las TiPNPs son reseñadas. Para finalizar la introducción, se describe de manera didáctica y muy simplificada, la **electroquímica dinámica** y sus técnicas, ya que es el fundamento de la mayoría de las medidas experimentales de este trabajo.

## 1.1 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

Los electrodos serigrafiados (SPEs) son dispositivos miniaturizados<sup>1</sup> fabricados usando la tecnología *thick-film* (también llamada *screen-printing*) y que son ampliamente utilizados como transductores en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos para

---

<sup>1</sup> La **miniaturización** es una tendencia en la Química Analítica que consiste en fabricar instrumentación y herramientas de análisis cada vez más pequeñas, con el objetivo de hacerlos portables, capaces de ser producidos en masa y de necesitar menores volúmenes de muestra.

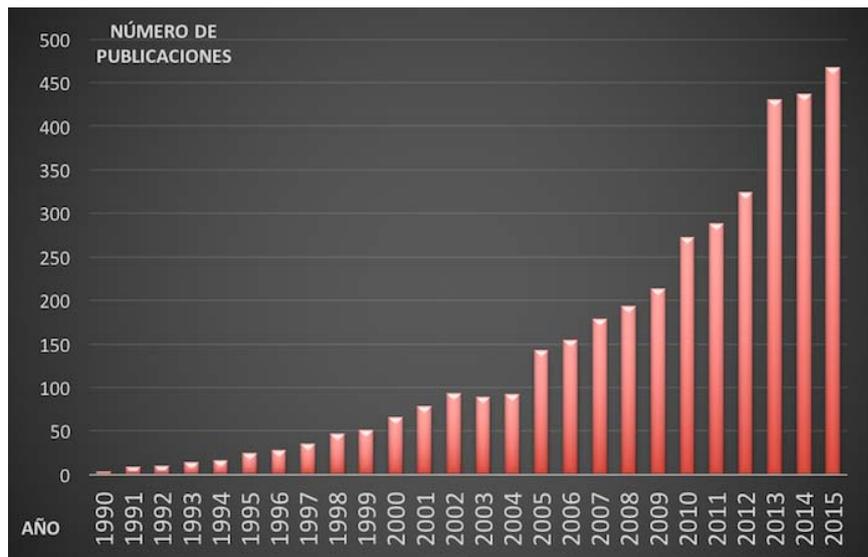


Figura 1.1: Número de publicaciones en la base de datos de Scopus de una búsqueda por el término de “screen-printed electrodes”.

análisis *Point-of-Care* (POC) y monitorización descentralizada. Prácticamente, toda la producción de tiras reactivas para el análisis de glucosa en sangre es fabricada con esta tecnología. Su gran éxito es debido a un buen comportamiento electroquímico unido a un bajo coste y facilidad de uso. Estas características han contribuido a que la cantidad de artículos científicos publicados en la literatura haya aumentado en los últimos años como se ilustra en la [Figura 1.1](#), y que se puedan adaptar a diferentes aplicaciones en ámbitos tan variados como el industrial, medioambiental, agroalimentario y clínico/farmacéutico. Por citar algunos ejemplos, se han estudiado aplicaciones tan diversas como la detección de metales pesados<sup>1</sup>, caracterización de nanopartículas<sup>2,3</sup>, espectroelectroquímica<sup>4</sup> o biosensores<sup>5,6,7,8</sup>.

Los electrodos serigrafados han ido desplazando a los electrodos convencionales más utilizados como son los de pasta de carbono, carbono vítreo o metálicos (oro, platino, mercurio). Estos electrodos convencionales presentan ciertas desventajas frente a los SPEs. En primer lugar, se encuentra el mayor tamaño de estos dispositivos, como puede observarse en la [Figura 1.2](#), ya que suelen colocarse en un cilindro de un material inerte y que tiene un contacto conductor para su conexión al potencióstato. Por este mayor tamaño y su diseño, normalmente son utilizados en una celda convencional que contiene un volumen de electrolito del orden de los 10-20 mL. Además, es necesario utilizar electrodos de referencia y auxiliar externos, que normalmente presentan un tamaño similar. Debido al mayor precio de estos electrodos (en comparación a los electrodos miniaturizados) es necesaria su reuti-



Figura 1.2: Electrodo convencionales de mercurio, pasta y carbono vítreo junto a electrodos serigrafiados desechables.

lización en diferentes medidas, y por tanto, debe realizarse una limpieza de su superficie para eliminar residuos de los experimentos previos. Esta limpieza puede consistir tanto en un simple tratamiento electroquímico hasta diferentes tratamientos químicos, electroquímicos y mecánicos, que conducen a un procedimiento analítico muy complejo. En el caso de los electrodos de pasta de carbono, aunque podrían utilizarse con una filosofía desechable, su fabricación se suele realizar en el laboratorio de forma manual, un proceso que consume un tiempo considerable y puede dar lugar a una superficie irreproducible entre electrodos. Estos problemas de los electrodos convencionales se intensifican cuando se trata de desarrollar biosensores electroquímicos, ya que los bioensayos suelen comprender tiempos de reacción largos. En contraste, varios SPEs pueden ser utilizados de manera (casi) simultánea para hacer las reacciones biológicas. Esto resulta en un aumento considerable del rendimiento de análisis (mayor número de análisis en el mismo tiempo) en comparación con los electrodos convencionales mencionados.

En relación al diseño de los SPEs, el más básico, pero también más utilizado, es el que se representa en la [Figura 1.3](#). El electrodo de trabajo con geometría circular está rodeado por los electrodos de referencia y auxiliar. Este diseño permite conectar eléctricamente los tres electrodos entre sí con la adición de un pequeño volumen de electrolito sobre ellos. Este diseño puede variar ligeramente, habiendo ejemplos con un electrodo de trabajo de menor diámetro o un electrodo auxiliar de mayor área. La fabricación *a la carta* permite obtener cualquier diseño definido por el fabricante. Una de las últimas tendencias en la

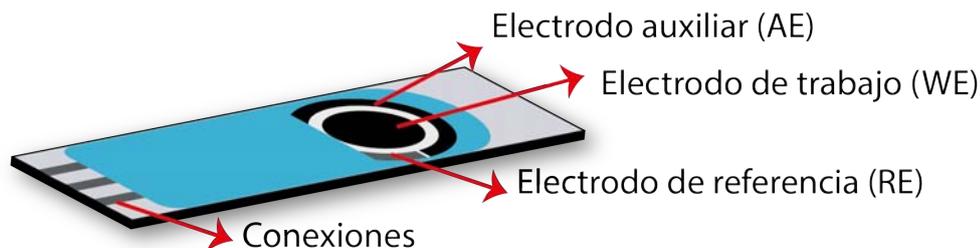


Figura 1.3: Diseño más típico de un electrodo serigrafiado.

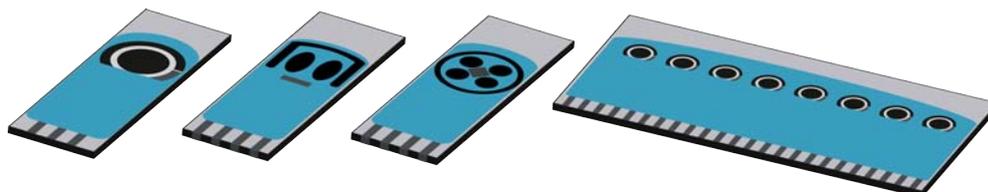


Figura 1.4: Diferentes diseños de electrodos serigrafiados.

miniaturización de electrodos serigrafiados se encuentra en el desarrollo de dispositivos multidetección. Dentro de este grupo, los más básicos son las tarjetas con dos electrodos de trabajo, que comparten electrodo de referencia y auxiliar. Estos dispositivos permiten realizar la detección simultánea de dos analitos en una misma muestra. Otro ejemplo son las tarjetas multielectrónicas de 8 electrodos. Estas tarjetas, de unos pocos cm de largo, contienen 8 celdas de tres electrodos serigrafiados, y permiten la realización de medidas en todas las celdas de manera simultánea con un potenciostato multicanal (Figura 1.4). En el ámbito de los dispositivos electródicos multidetección destacan las placas serigrafiadas de 96 celdas electrónicas (réplica de las conocidas placas ELISA)<sup>9</sup>. Las ventajas de este tipo de sistemas son un menor coste por la fabricación en masa como si fuera un circuito electrónico y la posibilidad de realizar medidas simultáneas con gran sencillez.

En el pasado, muchos laboratorios de investigación tenían un sistema para fabricar SPEs, pero en la actualidad existen diferentes empresas que los comercializan a gran escala con una gran reproducibilidad y diseños y materiales variados. Esto ha permitido fabricar accesorios e instrumentación adaptada para trabajar con este tipo de electrodos, aumentando en mayor medida su aplicabilidad en diferentes campos. En primer lugar hay que destacar los sistemas de conexión entre estos electrodos y el potenciostato que va a ser el responsable de llevar a cabo la medida correspondiente. Existen conexiones de diferentes tipos según sea el diseño del electrodo serigrafiado y la aplicación que se vaya a realizar. Varios ejemplos de estos conectores se muestran en la Figura 1.5. Por ejemplo, existen conectores en formato caja para electrodos individuales (con tres conexiones) o de doble



Figura 1.5: Diferentes conectores para electrodos serigrafados.

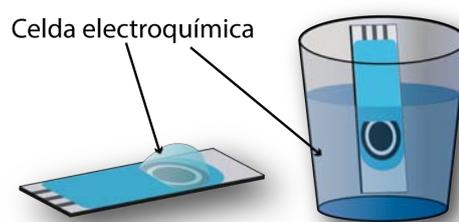


Figura 1.6: Las dos configuraciones típicas de una celda electroquímica utilizando electrodos serigrafados.

electrodo de trabajo (cuatro conexiones), Por otro lado, para análisis in situ o sistemas de análisis por inyección en flujo, existen cables con un pequeño adaptador en el extremo para conectar el SPE. Para diseños más complejos, como las tarjetas multielectrónicas de 8 canales o las placas serigrafadas con 96 electrodos, también existen interfases específicas para facilitar su conexión a los potenciostatos.

Otro aspecto a destacar de los SPEs es que pueden ser utilizados en diferentes posiciones. La forma más común de utilización es en una posición horizontal, utilizando el área que contiene los tres electrodos como contenedor de una gota de electrolito formando la celda electroquímica (Figura 1.6). Normalmente, solamente es necesario un volumen de pocos  $\mu\text{L}$  (entre 10-100  $\mu\text{L}$ ) para hacer contacto con los tres electrodos, por lo que el consumo de muestra es muy bajo. Sin embargo, la versatilidad de estos dispositivos, permiten utilizarlos en una celda convencional de mayor volumen, que podría estar en agitación con el consiguiente aumento en la transferencia de masa debido a la convección.

#### 1.1.0.1 *Características de los electrodos serigrafiados*

La popularidad que han adquirido los electrodos serigrafiados en los últimos años es debido a las importantes ventajas que presentan frente a otras herramientas electrónicas, entre las que destacan:

- **Bajo coste:** estos dispositivos se pueden producir en masa y de manera automatizada, y por lo tanto, el coste final de cada tarjeta es relativamente bajo. Además, con la tendencia a utilizar cada vez sustratos más baratos en donde realizar la serigrafía (plástico, papel), el coste todavía disminuye más. Esto permite que se puedan utilizar con un carácter desechable (usar y tirar), y puedan ser eliminados después de hacer cada análisis. Esta característica es de verdadera importancia para ciertos tipos de muestras complejas, que pueden invalidar la superficie electrónica tras una sola medida. Esta desechabilidad permite desterrar de los laboratorios los tediosos procedimientos de limpieza de los electrodos convencionales, de mayor coste, y por tanto, con la necesidad de reutilización. En algunos casos, por ejemplo con electrodos de oro, además de un proceso tedioso de limpieza, especies tóxicas como cianuro o tiocianato son también utilizadas. Por otro lado, se evita el mantenimiento de los electrodos de referencia convencionales, que es, también, un proceso muy necesario en los laboratorios de electroquímica.
- **Flexibilidad del diseño:** como se destacó anteriormente, aunque existen diferentes diseños comerciales, es posible el diseño y fabricación de electrodos serigrafiados personalizados. Esto concede a los investigadores poder realizar un diseño específico para una aplicación. Además, esta flexibilidad del diseño va a permitir, que según se vayan obteniendo mejoras tecnológicas en los instrumentos de medida y fabricación, puedan ser lanzados al mercado diseños novedosos y más complejos que mejoren en gran medida los electrodos actuales. Por otro lado, la cantidad de posibles materiales electrónicos (cualquier polvo de un material conductor) es otra de sus ventajas, ya que se pueden desarrollar nuevos materiales electrónicos que pudieran presentar excelentes propiedades electroquímicas.
- **Pequeño tamaño:** los electrodos serigrafiados son dispositivos portátiles de pocos cm de largo, que pueden ser manejados y transportados fácilmente. Esto tiene ventajas tanto para el fabricante, en su almacenamiento como en transporte, y también para el usuario final, ya que además permite llevarlos al lugar del análisis para

realizar una determinación *in situ* sin tener que transportar las muestras hasta el laboratorio. Otra ventaja inherente del pequeño tamaño es el bajo volumen de muestra necesario para realizar las medidas (pocos  $\mu\text{L}$ ). Además, si se utiliza de manera horizontal, como se ha comentado, no es necesaria una celda electroquímica externa donde colocar la muestra.

- **Posibilidad de pretratamientos y modificaciones:** la robustez de los materiales y los diseños de los electrodos serigrafados permiten una fácil modificación de la superficie con otro tipo de materiales para mejorar las propiedades químicas o electroquímicas que presentan y su empleo en nuevas aplicaciones. Los SPEs se han modificado con numerosos materiales entre los que destacan: nanotubos de carbono, grafeno, proteínas, hebras de ADN, monocapas autoensambladas, nanopartículas metálicas o semiconductoras. Además, la superficie electródica puede ser tratada de diferentes formas para mejorar sus propiedades electroquímicas, como por ejemplo, mediante la aplicación de un plasma o adición de especies químicas .
- **Rapidez de análisis:** la posibilidad de trabajar con un conjunto de electrodos serigrafados casi de manera simultánea permite aumentar el rendimiento de trabajo en el desarrollo de sensores y biosensores en comparación a los electrodos convencionales. Si, además, se utilizan los últimos diseños como las tarjetas multielectrónicas de 8 canales o las placas de 96 celdas, la cantidad de medidas que pueden ser realizadas con este tipo de electrodos en un tiempo fijo es muy elevada. Esto permite, para un investigador, un rápido desarrollo y una optimización muy eficiente cuando se está diseñando y desarrollando una metodología para sensores o biosensores electroquímicos. Y para un usuario final, puede aumentar la cantidad de análisis que se llevan a cabo en el mismo tiempo en el que antes se realizaba un sólo análisis. Esto es muy importante en ciertas situaciones, como por ejemplo en hospitales, donde se realizan un gran número de análisis, y en consecuencia, estos últimos avances tecnológicos pueden acercar los electrodos serigrafados a aplicaciones comerciales.

Los mayores inconvenientes que presentan los electrodos serigrafados no suelen ser importantes, y pueden no tener ningún efecto en las típicas condiciones experimentales en las que se utilizan, pero destacaría los siguientes:

- Históricamente, se ha señalado una **falta de reproducibilidad** entre diferentes lotes de producción. Sin embargo, este problema no es muy frecuente en la actualidad

para los electrodos comerciales, ya que su fabricación está altamente controlada y optimizada, y se obtienen electrodos muy reproducibles. Aunque es fácil comprobar, por técnicas microscópicas, que la superficie electródica no es igual en dos electrodos serigrafiados, estas diferencias estructurales no se traducen en una respuesta electroquímica muy diferente al realizar medidas de manera usual, como normalmente se utilizan este tipo de electrodos. Además, en unas condiciones de medida que estuvieran fuertemente afectadas por procesos superficiales, se podrían realizar diferentes pretratamientos, tanto químicos como electroquímicos<sup>10,11,12</sup>, para obtener una superficie más homogénea y reproducible.

- Estos dispositivos presentan un electrodo de referencia sólido, normalmente de plata, que no es un electrodo idealmente no polarizable (ver [Capítulo A](#)), y funciona como un **electrodo de quasireferencia**. Por tanto, en ciertas condiciones experimentales, el potencial de este electrodo podría no ser totalmente reproducible y estable a lo largo de un experimento. Además, el potencial de este electrodo podría variar al utilizar diferentes electrolitos de fondo y no puede ser definido de manera precisa<sup>13</sup>. Algunos autores han intentado mejorar el comportamiento del electrodo de referencia, ya sea generando una película fina de AgCl en la superficie (aunque no dejaría de ser un electrodo de quasireferencia), o además de la película de AgCl, añadir un polímero con una cantidad constante de Cl<sup>-</sup> para mantener el potencial de este electrodo. Aunque esta podría ser una desventaja en algunos experimentos muy específicos (quizás si la densidad de corriente es muy elevada), en la mayoría de casos donde se utilizan electrodos serigrafiados, el potencial se mantiene estable y reproducible. En contraste, una ventaja de usar un electrodo de quasireferencia es que, al no contener un puente salino, puede ser colocado en una posición cercana al electrodo de trabajo, con la consiguiente disminución de la resistencia incompensada de la celda, y por tanto, de la caída óhmica (ver [Capítulo A](#)).
- El diseño más empleado de los electrodos serigrafiados presenta un **electrodo auxiliar con menor área que el electrodo de trabajo**. Un electrodo auxiliar de mayor área superficial que el electrodo de trabajo permite que la semi-reacción que se produce en el electrodo auxiliar<sup>2</sup> pueda llevarse a cabo rápidamente y que no limite el proce-

<sup>2</sup> En un sistema electroquímico, cuando se produce una reacción en el electrodo de trabajo se está produciendo una reacción contraria en el electrodo auxiliar. Por ejemplo, si en el electrodo de trabajo se está oxidando una especie, en el auxiliar se estará reduciendo otra especie distinta. Esta especie puede encontrarse en la disolución o ser el electrolito de fondo, o incluso la especie generada en el electrodo de trabajo (si es (quasi)reversible y la transferencia de masa es rápida para llegar a la superficie del electrodo auxiliar).

so de interés que se produce en el electrodo de trabajo (especialmente si la velocidad de reacción en este electrodo es lenta). Si la reacción en el electrodo auxiliar requiere de un potencial muy elevado para producir la densidad de corriente suficiente, este potencial puede afectar a la composición de la disolución (la misma corriente que fluye por el electrodo de trabajo debe fluir por el auxiliar, por tanto con un área menor, la densidad de corriente que fluye será mayor, y el sobrepotencial necesario para fijar esta corriente puede ser elevado). Sin embargo, la densidad de corriente que se genera en un experimento típico con electrodos serigrafados no es muy elevada (a no ser que la concentración de la especie redox y su velocidad de reacción fuera muy alta), y sería difícil que este hecho ocurriera. Otra desventaja es la cercanía del electrodo auxiliar al electrodo de trabajo, ya que la reacción que se produce en el electrodo auxiliar podría llegar a interferir con la reacción en el electrodo de trabajo (por ejemplo, por un cambio de pH, si se está eliminando o generando  $H^+$ ). Aunque, por lo general, estos electrodos se utilizan con una disolución estática, y la difusión de las especies no suele ser suficiente para que surja este problema en la escala de tiempo de un experimento típico.

- Los electrodos serigrafados pueden contener algunas **impurezas** en la composición de las tintas, como por ejemplo, plata<sup>14</sup>, que pueden tener un efecto determinante en el análisis a desarrollar por una disminución de la ventana de potenciales posible o que hiciera necesario una etapa de limpieza para eliminar esas impurezas.

#### 1.1.0.2 Fabricación de electrodos serigrafados

Los electrodos serigrafados se fabrican con la tecnología de microfabricación *screen-printing* que permite obtener electrodos sólidos planos, mecánicamente robustos, y con la geometría deseada. Esta tecnología está bien establecida industrialmente en la actualidad para la producción en masa de estos dispositivos mediante una fabricación sencilla, rápida y versátil. Normalmente, los SPEs son fabricados en un pequeño sustrato, generando dispositivos miniaturizados y maximizando la producción, hecho que conduce a dispositivos de bajo coste<sup>15,16</sup>. Esto permite su utilización con una filosofía desechable, evitando procedimientos de limpieza complejos de los electrodos tras su uso. En una configuración típica, estos dispositivos son fabricados configurando una celda electroquímica de tres electrodos en un sustrato plástico o cerámico. Las pistas conductoras (electrodos y conexiones) son generadas por una tinta, que, como mínimo, contiene el material conductor,

un aglutinante y un disolvente. Ciertos tipos de tintas pueden contener una combinación de otros agentes como humectantes, antiespumantes, conservantes y espesantes. Un material aislante en la capa más externa del dispositivo forma la geometría final de la celda electroquímica. Los aditivos son añadidos a la tinta para mejorar el proceso de fabricación e incrementar la adhesión de la tinta al sustrato. Aunque el disolvente se elimina en una etapa de curado a alta temperatura, el aglutinante y otros aditivos (si los tuviera) quedan formando parte del material electródico. El aglutinante es, normalmente, un polímero no electroactivo, que puede disminuir la transferencia electrónica debido al bloqueo de las partículas conductoras<sup>17,18</sup>. La composición de la tinta para serigrafiar es información propietaria del fabricante, pero algunos de los aglutinantes más utilizados suelen ser resinas epoxy, alquídicas, fenólicas o de poliuretano. En algún estudio previo, se ha encontrado que el aglutinante en varias de las tintas utilizadas consiste básicamente de cloruro de polivinilo (PVC)<sup>19</sup>. Se disponen gran cantidad de tintas comerciales para serigrafiar, siendo las más empleadas las de grafito, oro, plata y platino, pero la posibilidad de combinarlas con otras especies químicas, permite obtener una variedad de tintas casi ilimitada. De esta manera, se pueden fabricar dispositivos con unas características adecuadas para cierto tipo de aplicación. La tinta elegida para la fabricación es un parámetro crítico ya que va a tener una gran influencia en el comportamiento final del dispositivo. De hecho, tintas fabricadas con el mismo material (por ejemplo, grafito), pueden presentar diferencias en sus características<sup>20</sup>. El comportamiento de una especie puede variar usando diferentes tintas, y por tanto, al utilizar diferentes electrodos comerciales<sup>21</sup>. Por este motivo, es importante el estudio y la caracterización de los electrodos serigrafiados que se emplean en una aplicación determinada.

El proceso de fabricación de los electrodos serigrafiados, esquematizado en la [Figura 1.7](#), consiste, de manera muy simplificada, en la deposición de una tinta conductora sobre un sustrato a través de una máscara. Esta máscara se emplea para dar el diseño y tamaño deseado al electrodo fabricado<sup>22,23,24</sup>, y la tinta se empuja a través de los poros de la máscara por medio de una rasqueta. En la actualidad este proceso se realiza con máquinas automáticas para mejorar el proceso en cuanto a rapidez y reproducibilidad. A continuación, se realiza una etapa de secado de la tinta y curado a alta temperatura, y por último, se recubre con un material aislante para dejar libre solamente las conexiones y el área de trabajo del dispositivo. Este proceso se puede adaptar a distintos sustratos, siendo los más comunes, materiales cerámicos (como óxido de aluminio) o poliméricos (PVC, policarbonato), aunque también han sido descritos materiales como nitrocelulosa<sup>25</sup>



Figura 1.7: Esquema de las etapas de fabricación de electrodos serigrafiados.

o fibra de vidrio<sup>26</sup>. En los últimos años, se está comenzando a usar papel y sus derivados (acetato de celulosa) como sustrato para el serigrafiado, obteniendo un ahorro de coste significativo en la fabricación.

### 1.1.0.3 Comportamiento electroquímico de electrodos serigrafiados de grafito

El grafito es el material más empleado para los electrodos de trabajo serigrafiados ya que es químicamente inerte, presenta una baja corriente de fondo, una ventana de potenciales amplia y es de bajo coste<sup>27</sup>. El carbono puede presentarse en una variedad de materiales, incluyendo grafito, diamante, fibras de carbono, carbón, o nanomateriales como fullereno, grafeno o nanotubos de carbono, entre otros. Estos materiales pueden presentar diferentes propiedades físicas y químicas dependiendo de su estructura. Un material de carbono utilizado frecuentemente para estudiar las propiedades generales del carbono es el grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG), ya que es un material sintético que se asemeja al grafito convencional, y su estructura puede ser, más o menos, controlada. Este control puede generar un grafito con una mayor densidad de defectos (superficiales y *step edges*) en la superficie expuesta o puede generar un grafito con menos defectos y mayor densidad de planos basales (ver Figura 1.8), y de esa manera poder estudiar el efecto de estas estructuras en las propiedades electroquímicas. De manera general, se ha pensado que los planos de borde (*edge planes*) dominaban la actividad electroquímica y los planos basales jugaban sólo un pequeño papel en la actividad global. Sin embargo, con las nuevas técnicas electroquímicas microscópicas con alta resolución espacial se ha podido comprobar como los planos basales también son altamente electroactivos.

La caracterización electroquímica en la macroescala de diferentes electrodos serigrafiados de grafito (SPCEs) comerciales o fabricados en el laboratorio ha sido previamente publicada usando diferentes especies electroactivas. El efecto de la tinta de carbono<sup>20</sup>, la naturaleza y cantidad de aglutinante utilizado en la fabricación<sup>28,29</sup> y otros aspectos<sup>19</sup> fueron evaluados. La idea general es que el comportamiento de los SPEs puede estar in-

fluenciado por varios factores como: la naturaleza del grafito utilizado en la tinta, en la que una mayor cantidad de defectos *edge plane* facilita la transferencia electrónica<sup>19</sup>, la cantidad de grafito en la tinta o la diferente funcionalización del grafito. La cantidad de aglutinante orgánico añadido a la tinta también posee un efecto importante en la actividad electroquímica (y en la morfología electródica)<sup>29</sup>. Se encontró que una cantidad creciente de aglutinante hacía disminuir la constante de velocidad de la transferencia electrónica heterogénea ( $k^o$ ) para un proceso redox de transferencia electrónica de esfera externa. Los autores encontraron que el recubrimiento de la superficie electródica con defectos *edge plane* decrecía con la cantidad de aglutinante, y concluyeron que la reactividad electroquímica podía ser ajustada de esta manera. La temperatura de curado puede tener también un fuerte efecto en la estructura del electrodo y el rendimiento electroquímico. Una superficie electródica más lisa es obtenida con temperaturas de curado bajas (requeridas para sustratos de plástico). En estos casos, se encuentra un comportamiento electroquímico no ideal, y generalmente, se requiere una activación de la superficie electródica<sup>30,11</sup>. Una mayor temperatura de curado, utilizada para sustratos cerámicos (como los utilizados en esta Tesis Doctoral), da lugar a una evaporación del disolvente más rápida y superficies más rugosas con grietas, bordes y huecos. Estas superficies más heterogeneas muestran una mejor respuesta electroquímica<sup>21</sup>, que se atribuye a una mayor exposición de los defectos *edge plane*<sup>19</sup>. Sin embargo, estos estudios en la macroescala solamente muestran una respuesta electroquímica promedio y, por tanto, no pueden proporcionar información sobre el diferente comportamiento de la estructura tan heterogénea en un SPE. Aunque parece haber un consenso que gran parte de la superficie serigrafiada muestra una baja actividad o transferencia electrónica lenta debido a la presencia del aglutinante no electroactivo, este hecho ha sido solamente estudiado con medidas macroscópicas, asumiendo implícitamente que toda la superficie se comporta como la respuesta promedio. Por tanto, muy poco se conoce sobre el comportamiento en la microescala de la superficie heterogénea de los SPEs.

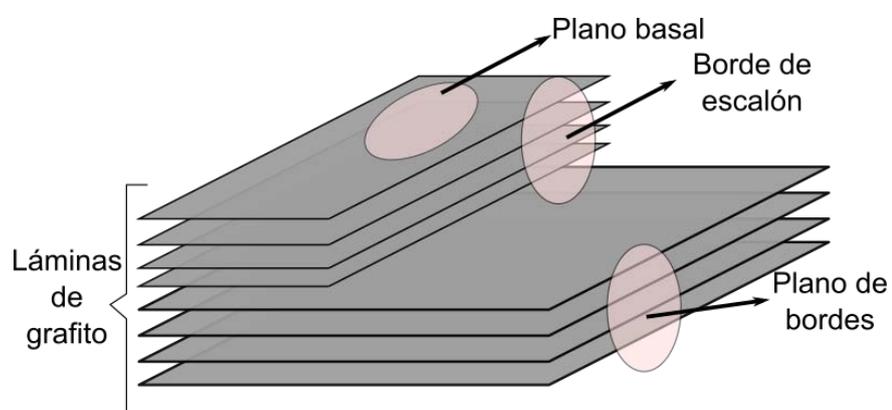


Figura 1.8: Estructura laminar del grafito y sus principales componentes

## 1.2 SENSORES Y BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

En la actualidad existe una importante necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que presentan sectores tan dispares como el industrial, clínico, agroalimentario, medioambiente o forense. De una manera general, los análisis químicos llevados a cabo en todos estos sectores presentan ciertos inconvenientes como son un alto precio de los materiales y equipamiento analítico necesario, tiempos de análisis elevados y procedimientos complejos que solamente pueden ser realizados por técnicos especializados. Idealmente, estos problemas deben ser resueltos con dispositivos analíticos sensibles, sencillos, rápidos, fiables, de bajo coste y portátiles que permitan la detección *in situ* de las especies de interés para responder con gran celeridad cuando se encuentra un problema. Los sensores y biosensores químicos son dispositivos que pueden ayudar a resolver diferentes problemas analíticos con estas propiedades ideales.

Según la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo que transforma información química (cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa) en una señal analíticamente útil<sup>31,32</sup>. Como se ilustra en el esquema de la [Figura 1.9](#), un sensor químico, normalmente, consta de dos componentes básicos conectados: un receptor<sup>3</sup>, que proporciona el reconocimiento del analito de interés y un transductor fisicoquímico, que convierte la señal química obtenida en una señal física medible. Los biosensores son sensores químicos en los que el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico. El objetivo del elemento sensor es proporcionar al sistema de un alto grado de selectividad hacia el analito. Un sensor químico debe ser un dispositivo integrado, es decir, todas las partes deben estar empaquetadas en la misma unidad, normalmente deberían ser de pequeño tamaño, y el receptor debería estar en contacto directo con el transductor para realizar la transducción directa a una señal medible. Sin embargo, existen multitud de trabajos publicados que se autodenominan sensores a dispositivos que no cumplen estas características, ya sea porque los dispositivos no poseen un elemento de reconocimiento selectivo o porque la fase sensora y el transductor no están integrados, y por tanto, no coinciden con la definición estándar. Este hecho se debe probablemente a que, en la actualidad, existe cierto *marketing* científico y publicar un dispositivo que se llama sensor puede tener más repercusión que si se denominara simplemente como dispositivo analítico. Algunos ejemplos son los “sensores” nanotecnológicos<sup>33</sup> o no enzimáticos<sup>34</sup>, que no poseen un elemento de reconocimiento selectivo a la

<sup>3</sup> El receptor puede llamarse también elemento de reconocimiento o elemento sensor. La fase sensora es la superficie que contiene el receptor inmovilizado. A lo largo de este texto se utilizarán los diferentes términos indistintamente.

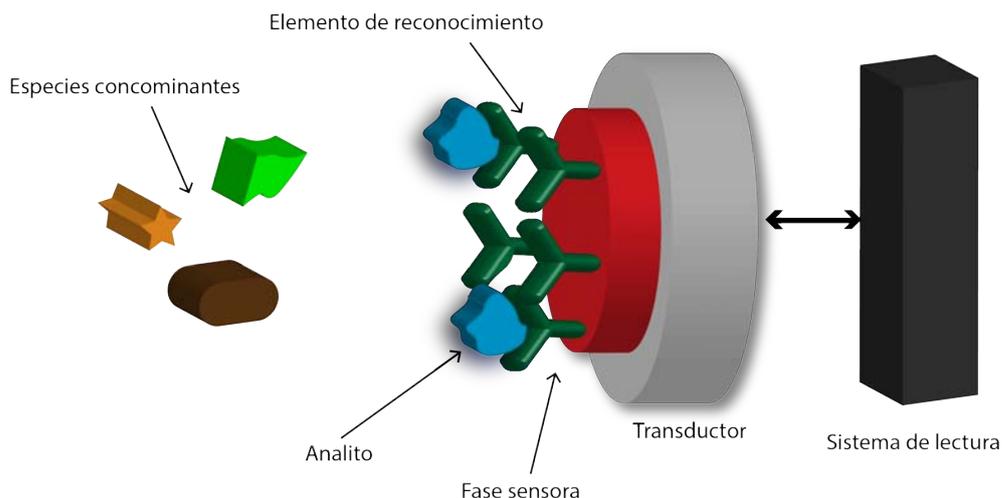


Figura 1.9: Esquema de los principales componentes de un sensor químico.

especie de interés frente a otras especies. Por tanto, nos encontramos en un momento que esta definición debe actualizarse para abarcar los nuevos dispositivos analíticos desarrollados en los últimos años o los investigadores deberíamos hacer un esfuerzo para ser más estrictos en este sentido y poder tener una separación clara entre dispositivos sensores y otro tipo de métodos analíticos modernos.

El primer biosensor fue descrito por Leland C. Clark en 1962<sup>35</sup>. A partir de su sensor de  $O_2$ <sup>36</sup>, descrito unos años antes, e incorporando glucosa oxidasa (GOx) en el dispositivo, fue capaz de convertir un simple electrodo de platino en un dispositivo analítico para determinar glucosa en muestras humanas. Esta invención fue el germen del sensor de glucosa tan utilizado en la actualidad para la monitorización de esta especie en personas diabéticas. La investigación en biosensores ha crecido rápidamente en los últimos años (ver Figura 1.10) debido a su potencial en campos como el diagnóstico clínico, monitorización de muestras medioambientales, procesos industriales o detección de agentes tóxicos/biológicos. Sin embargo, viendo la tendencia en el número de publicaciones científicas parece que se ha llegado a un *plateau* en la cantidad de investigación en este campo, y aunque se han conseguido avances importantes, no parece que haya ninguna tecnología tan notable en el mundo comercial como fue el desarrollo del sensor de glucosa.

Como en la definición de sensor o biosensor químico puede encajar una cantidad muy grande de diferentes dispositivos, existen otras clasificaciones más específicas en las que se distribuyen los sensores. Entre estas clasificaciones destacan las siguientes: según la naturaleza de la fase sensora y el mecanismo del proceso de reconocimiento, las caracte-

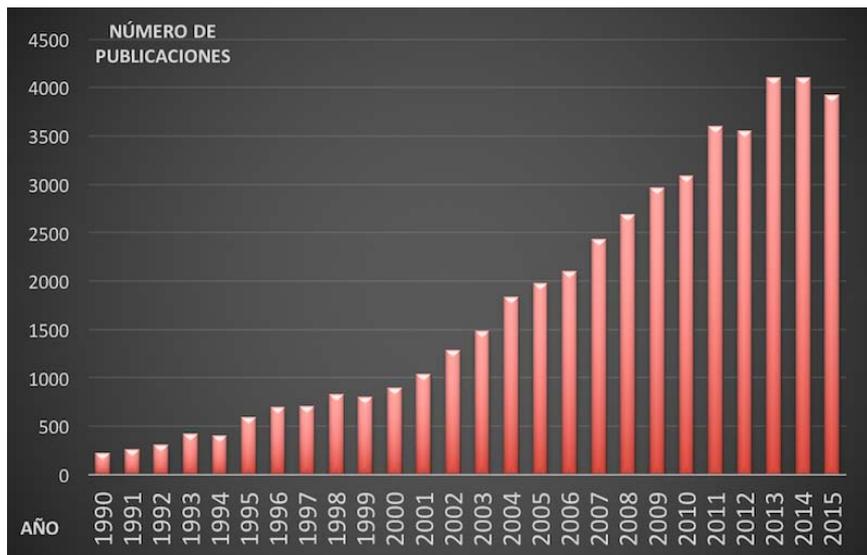


Figura 1.10: Número de publicaciones de una búsqueda en *Scopus* del término “biosensor” desde 1990.

rísticas del transductor, si en la detección es necesaria una marca externa, o el formato del ensayo utilizado. Por otro lado, considerando el tipo de instrumentación utilizada en los biosensores, dos categorías principales pueden distinguirse: 1) equipamiento de laboratorio sofisticado capaz de obtener medidas de interacciones biológicas complejas con gran exactitud, y 2) dispositivos portables, fáciles de usar, para análisis descentralizados. Aunque ambas modalidades pueden tener un interés inherente y resolver diferentes tipos de problemas, la utilización de los biosensores portátiles de bajo coste por personas no cualificadas técnicamente, incluso por los propios pacientes, los llamados dispositivos Point-of-Care (POC) puede ayudar en el futuro a la detección y monitorización de diferentes enfermedades con la posibilidad real de mejorar la calidad de vida de las personas. Por tanto, en el desarrollo de biosensores, los principales objetivos buscados son la facilidad, rapidez y bajo coste. Diferentes configuraciones en sistemas sensores han sido descritas, por ejemplo, mediante una sonda de inmersión (*dip-in-probe*), como el electrodo de vidrio para determinación de pH, sensores desechables con superficie plana que utilizan muy poco volumen de muestra, como los electrodos serigrafados, sensores de llenado capilar, formados por dos láminas con un espacio entre ellas que permite el movimiento de la muestra hasta la zona sensora o las tiras de flujo lateral, que poseen una capa porosa de material que permite el movimiento por capilaridad de la muestra (la más conocida es la tira de embarazo). Los sensores también pueden estar integrados en sistemas de análisis por inyección en flujo o implantados en tejidos o en organismos vivos.

### *Características analíticas de los (bio) sensores*

Las características analíticas de los biosensores se pueden determinar por los parámetros típicos utilizados en la caracterización de un método analítico normal ya que son dispositivos analíticos. Indican el ajuste de un sensor al comportamiento esperado como la calidad de resultados, estabilidad de la respuesta, robustez de operación y almacenamiento. Estos parámetros estadísticos son descritos extensamente en libros especializados<sup>37</sup>, pero una introducción muy breve de los más importantes se describe a continuación:

- **Exactitud:** indica el grado de coincidencia entre la concentración determinada por el biosensor y la concentración real del analito en la muestra. Se denomina error relativo (si se ofrece el resultado en porcentaje) o error absoluto (resultado directo) a la diferencia entre ambas concentraciones.
- **Precisión:** indica el grado de coincidencia entre los resultados de medidas independientes obtenidas bajo condiciones similares. Dentro de la precisión se pueden describir dos términos: la reproducibilidad y repetibilidad. La reproducibilidad indica la capacidad del sensor de dar resultados similares bajo condiciones diferentes (diferentes operadores, aparatos, laboratorios o después de largos períodos de tiempo). La repetibilidad es la capacidad del sensor de dar resultados similares en una secuencia de medidas de una muestra idéntica llevadas a cabo en las mismas condiciones. En el caso específico de utilizar electrodos serigrafiados se pueden describir dos parámetros de precisión: la reproducibilidad intraelectródica y la reproducibilidad interelectródica. La reproducibilidad intraelectródica es la capacidad del sensor de ofrecer resultados similares en medidas repetidas usando el mismo electrodo (similar a la repetibilidad). La reproducibilidad interelectródica indica la capacidad de diferentes sensores fabricados en las mismas condiciones de dar los mismos resultados de la medida de la misma muestra.
- **Selectividad:** indica el grado de discriminación de un sensor para determinar un analito sin interferencias de otras especies en la muestra. Si un concomitante de la muestra afecta a la respuesta del sensor por interactuar con la superficie sensora, esto produce una interferencia no específica.
- **Rango dinámico:** es el rango de concentraciones que es capaz de detectar el sensor.
- **Sensibilidad:** refleja el cambio en la respuesta producido por una variación de unidad en la concentración. Si la respuesta del sensor viene relacionada de forma lineal

con la concentración, en una recta de calibrado, la pendiente de esta recta es la sensibilidad.

- **Límite de detección (LOD):** es la menor concentración a la cual el sensor puede proporcionar resultados fidedignos. El LOD es la menor concentración del analito que puede ser distinguida de la ausencia del analito (blanco de reactivos). Un bajo LOD se obtiene cuando tanto la respuesta como el ruido (en términos de desviación estándar) para el blanco son bajas. El límite de cuantificación es un parámetro de mayor confianza para dar la menor concentración detectable por el sensor, y normalmente equivale a 3 veces el LOD.
- **Tiempo de respuesta:** es el tiempo que transcurre desde que se añade el analito al sensor hasta que la respuesta del sensor llega a un valor prácticamente constante. Antes de llegar a este valor, el sensor funciona en régimen transitorio (su respuesta varía con el tiempo). Tanto la velocidad de difusión del analito hacia el elemento de reconocimiento como la velocidad de la formación del complejo determinan el tiempo de respuesta. Uno de los objetivos más importantes en el desarrollo de biosensores es disminuir el tiempo de respuesta para conseguir análisis rápidos.

#### *Elemento de reconocimiento*

El reconocimiento molecular consiste en una interacción selectiva que conlleva la formación de un complejo entre la molécula reconocida (especie objetivo) y el elemento de reconocimiento (que en los biosensores está inmovilizado en el transductor). Existen diferentes elementos de reconocimiento de naturaleza biológica que han sido empleados en biosensores, y en los últimos años se han desarrollado algunos sintéticos. Una de las clasificaciones más utilizadas de los biosensores es según sea la naturaleza de su elemento de reconocimiento. En este sentido, dos tipos generales de elementos de reconocimientos se conocen: catalíticos y de afinidad. Aunque no se considera aquí, una membrana permselectiva que deja traspasar ciertos iones puede también ser utilizado como elemento de reconocimiento<sup>4</sup>. En los biosensores catalíticos, el elemento de reconocimiento genera una reacción catalítica con la especie objetivo, mientras que en los biosensores de afinidad, el reconocimiento se produce por la formación de un complejo entre el elemento sensor y la especie objetivo. A continuación, se describen los principales tipos de elementos de reconocimiento:

---

<sup>4</sup> Aunque en este caso, no se trata de un reconocimiento molecular, sino iónico.

### Elementos de reconocimiento catalíticos

Los elementos de reconocimiento catalítico poseen una función receptora, capaz de reconocer específicamente un compuesto (o familia de compuestos) y una función catalítica, capaz de causar una reacción catalítica de la especie reconocida, regenerando el receptor para un nuevo reconocimiento.

- Enzimas

Los biosensores basados en enzimas son los biosensores catalíticos más utilizados. Las enzimas son proteínas que pueden catalizar una reacción química de naturaleza biológica. El compuesto reactivo se llama sustrato, y, normalmente, implica el uso de otro reactivo (cofactor) para poder llevar a cabo la reacción. Para que la reacción enzimática se produzca, el sustrato debe formar un complejo enzima-sustrato ya que la enzima es capaz de unir de esta forma un sustrato particular o una clase específica de compuestos. El reconocimiento enzimático es un proceso dinámico que consta de tres etapas principales ilustradas en la [Figura 1.11](#):

1. el sustrato es enlazado al sitio de unión de la enzima mediante la formación del complejo
2. el sustrato experimenta una reacción química con la participación del cofactor
3. el producto generado se libera y el sitio activo de la enzima vuelve al estado inicial para comenzar un nuevo ciclo de reacción

La transducción puede llevarse a cabo con la detección de un producto o correactante del proceso enzimático. Existen diferentes formatos de utilización con el objetivo de cuantificar el sustrato, alguna especie inhibidora de la reacción enzimática, o incluso pueden ser utilizadas como marca de transducción en biosensores de afinidad. Las ventajas más importantes de los biosensores enzimáticos son su elevada selectividad, una respuesta rápida, se autoregeneran y los dispositivos suelen ser bastante sencillos. Como mayores inconvenientes pueden ser el alto coste de muchas enzimas, o la baja estabilidad cuando no se utiliza en un medio óptimo (su funcionalidad depende del pH, temperatura, etc.). El sensor comercial de glucosa, ampliamente comercializado, es un sensor enzimático, que posee una enzima específica a la glucosa.

- Células y tejidos

## Ciclo enzimático

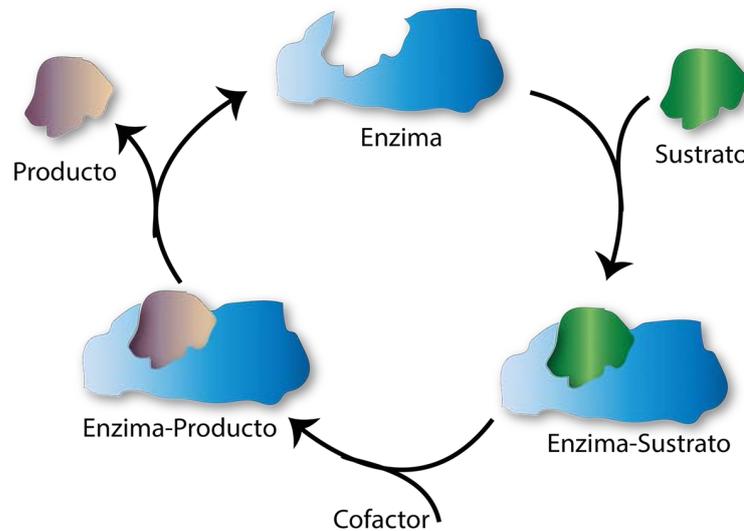


Figura 1.11: Ciclo de una reacción enzimática típica.

Diferentes células o tejidos de origen biológico pueden también ser utilizados como elemento de reconocimiento ya que poseen enzimas en su composición, que pueden funcionar como elemento de reconocimiento. Sus ventajas son un bajo coste, se evita los procesos de extracción y purificación de las enzimas, pero la respuesta es más lenta y poseen una limitada selectividad (ya que puede haber diferentes tipos de enzimas o especies de diferente composición).

### Elementos de reconocimiento por afinidad

El reconocimiento por interacciones de afinidad involucra un enlace reversible múltiple entre dos especies químicas a través de enlaces no covalentes (iónicos, de hidrógeno o interacciones de van der Waals) para formar un complejo asociado. Estas especies son complementarias en la forma, tamaño y reactividad química, por lo que su unión está controlada por parámetros termodinámicos, normalmente se alcanza el equilibrio y no se consume más especie reactiva con el tiempo, a diferencia con el control cinético de los biosensores catalíticos. Algunas proteínas pueden enlazar por afinidad ciertos compuestos químicos, por ejemplo, la lectina enlaza carbohidratos, o la (estrept)avidina enlaza a la biotina.

Este tipo de biosensores se basan en la formación de un complejo, por lo que pueden ser estudiados según la teoría de enlace receptor-ligando<sup>38</sup>. La fracción del elemento de reconocimiento que está enlazada en un estado de equilibrio ( $\theta$ ) viene determinada por la

constante de disociación del complejo,  $K_d$  (inversa a la constante de afinidad,  $K_a = 1/K_d$ ), y la concentración del analito según la ecuación 1.1. Esta ecuación es una forma derivada de la isoterma de adsorción de Langmuir, que indica que al aumentar la densidad superficial del elemento sensor ( $\sigma$ ), no cambia  $\theta$  pero permite un cambio de la propiedad medida (típicamente relacionada a la densidad real de las moléculas del analito enlazadas,  $\theta\sigma$ ). Hay que considerar que una densidad del elemento de reconocimiento muy elevada puede inhibir el enlace del analito debido a interacciones estéricas u otros efectos.

$$\theta = \frac{[\text{Receptor} - \text{Analito}]}{[\text{Receptor}] + [\text{Receptor} - \text{Analito}]} = \frac{[\text{Analito}]}{[\text{Analito}] + K_d} \quad (1.1)$$

Los biosensores de afinidad, aunque con un gran potencial futuro, todavía no han alcanzado la etapa de desarrollo avanzado que poseen los sistemas enzimáticos. Al basarse en reacciones de equilibrio, normalmente son análisis más lentos, con un rango dinámico de concentraciones menor y no son capaces de ser usados de manera continua para monitorizar un analito. Sin embargo, las posibilidades que presentan en entornos clínicos, dónde están medianamente implantados, la versatilidad de los diferentes elementos de reconocimiento (con capacidad de hacerlos sintéticos, a la carta) y la extensa investigación en este campo, permitirán un uso más extendido en años venideros para el diagnóstico de enfermedades.

A continuación, se describen otras uniones por afinidad más concretas:

- Ácidos nucleicos

La función de los ácidos nucleicos en el organismo es una de las más conocidas popularmente, ya que sirven para almacenar y transferir la información genética en los seres vivos. Los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) almacenan la información genética, mientras que los ácidos ribonucleicos (ARN) se encargan de transferir esa información. Los ácidos nucleicos se componen de un esqueleto con varias nucleobases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), aunque esta última se reemplaza por uracilo (U) en el ARN. Las diferentes nucleobases pueden formar un complejo de unión, de manera específica: C-G y A-T (A-U en ARN). Este hecho es la base de la hibridación, proceso por el cual dos hebras de ácidos nucleicos forman un complejo muy fuerte por interacción de una hebra con su hebra complementaria (bases complementarias). La hibridación es el proceso utilizado en sensores (llamados genosensores) que utilizan ácidos nucleicos para el reconocimiento molecular. Son dispositivos muy interesantes para la identificación de microorganismos patógenos.

- Aptámeros

Los aptámeros son un material sintético formado por oligonucleótidos (ADN, ARN) o péptidos diseñados específicamente para formar una unión muy fuerte con ciertas moléculas o proteínas<sup>39</sup>. Su principal función es como sustitutos de los anticuerpos en inmunosensores, ya que suelen ser más sencillos de sintetizar (de manera artificial), de menor coste y poseen mayor estabilidad. También tienen la capacidad de unir moléculas pequeñas. Por tanto, los aptámeros son materiales con características prometedoras para el desarrollo de biosensores.

- Polímeros molecularmente impresos

Los polímeros molecularmente impresos (MIPs) son materiales poliméricos biomiméticos<sup>5</sup> con cavidades que presentan una alta selectividad frente a un compuesto determinado. Este polímero es sintetizado en presencia del compuesto objetivo (molécula molde), por lo que tras su eliminación, la estructura del polímero contiene sitios de unión complementarios en forma y orientación a los del compuesto objetivo. Además, esas cavidades pueden contener grupos funcionales que pueden enlazar reversiblemente este compuesto.

- Antígeno - Anticuerpo

La interacción antígeno-anticuerpo llamada reacción inmunológica es el fundamento de los inmunosensores, cuyo elemento de reconocimiento puede ser un antígeno o un anticuerpo. Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por el sistema inmune para identificar y neutralizar agentes externos (patógenos) al organismo que pudieran ser dañinos. La parte del patógeno que interacciona con el anticuerpo se llama antígeno. Los anticuerpos pueden también generarse para que respondan a haptenos, especies que no producen una respuesta inmune en el organismo (ya que son moléculas pequeñas indetectables)<sup>40</sup>. Los anticuerpos típicos son las inmunoglobulinas (Ig), una clase de proteínas abundantes en el plasma, siendo la más prevalente la inmunoglobulina G (IgG). En la [Figura 1.12](#) se muestra la estructura típica de un anticuerpo IgG. Presenta una forma de Y que contiene dos cadenas polipeptídicas pesadas (sobre 50 kDa cada una) y dos cadenas ligeras (sobre 25 kDa) enlazadas entre ellas. Las regiones constantes determinan el isotipo del anticuerpo (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), mientras que las regiones variables (Fv) de una cadena pesada y una cadena ligera constituyen el sitio de unión con el antígeno (son variables en diferentes anticuerpos para unir diferentes antígenos). Estas cadenas están unidas por

---

<sup>5</sup> La biomimética es el arte de imitar los procesos naturales

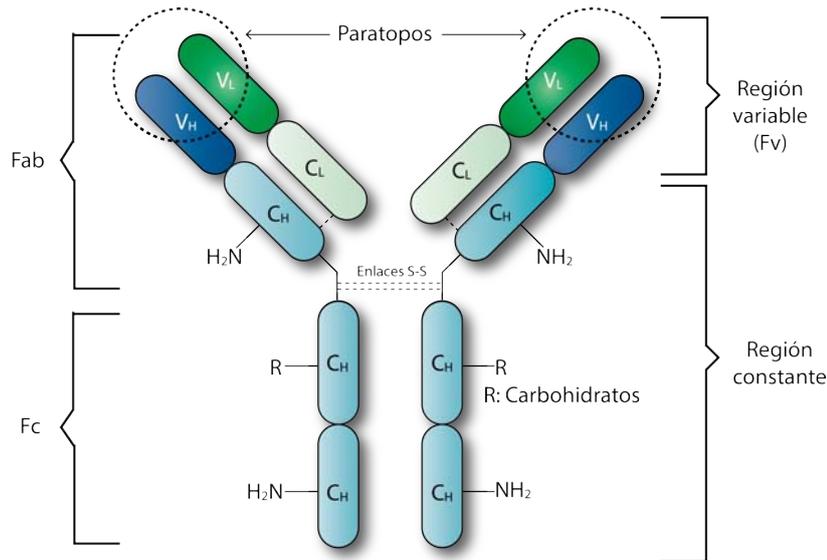


Figura 1.12: Estructura esquematizada de la inmunoglobulina G (IgG).

enlaces no covalentes y puentes disulfuro formando una estructura cuaternaria. Cada molécula de anticuerpo es bivalente ya que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos poseen grupos funcionales  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  y  $\text{-SH}$  que pueden ser utilizados para su funcionalización con otras especies de interés (biotina, proteínas, nanomateriales). La producción de anticuerpos pueden realizarse en animales (típicamente, ratones, conejos, cabras o camellos) o por cultivo celular. Según la forma de obtención se pueden obtener anticuerpos policlonales que pueden unirse a diferentes zonas del antígeno (epitopos), o anticuerpos monoclonales, que se unen a una sola zona específica del antígeno.

En la unión antígeno-anticuerpo se forma un complejo por múltiples enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, uniones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), normalmente un alto grado de complementariedad es necesario y se forma un enlace muy fuerte (reversible, pero solamente en condiciones extremas) por la alta afinidad entre ambos compuestos (constante de disociación entre  $10^{-12}$  y  $10^{-15}$  M). Este hecho hace que sea complicado la regeneración de superficies inmunosensoras, y normalmente son desechables. Explicando en mayor detalle el proceso, en primer lugar, antígeno y anticuerpo se acercan por difusión, y cuando la distancia entre epitopo y paratopo está alrededor de 10 nm, la atracción electrostática comienza a ser efectiva. Este proceso acerca las dos especies y las moléculas de agua son desplazadas, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno. A distancias más cortas, las interacciones de van der Waals e hidrofóbicas toman el papel principal para la formación final del complejo. Sadana et

al.<sup>41</sup> describieron en cierta medida la cinética de la interacción antígeno-anticuerpo y la influencia de la velocidad de difusión y otros factores. En la configuración con el antígeno en disolución y anticuerpo inmovilizado en la superficie, la interacción muestra una cinética de segundo orden (ecuación 1.2), donde  $\Gamma$  es la concentración superficial de anticuerpos que son enlazados por antígenos a un tiempo  $t$ ,  $\Gamma_0$  es la concentración superficial total de anticuerpos, y  $k$  es la constante de velocidad de la reacción. En el caso contrario, con el anticuerpo en disolución y el antígeno inmovilizado en la superficie, la reacción muestra una cinética de primer orden tanto para la concentración de anticuerpo cercana a la superficie o del antígeno inmovilizado (ecuación 1.3), es decir que tanto la concentración de anticuerpo en disolución como la concentración de antígeno inmovilizado influyen en la velocidad de reacción. Algunos parámetros que pueden tener una influencia en la cinética de estas reacciones son la concentración de analito, el pH de la muestra, efectos superficiales, temperatura, etc.

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k [\text{Antígeno}]^2 \Gamma_0 \quad (1.2)$$

$$- \left[ \frac{d\Gamma}{dt} = k [\text{Antígeno}] [\text{Anticuerpo}] \Gamma_0 \right] \quad (1.3)$$

#### Inmovilización del elemento de reconocimiento sobre el transductor

La modificación del transductor con el elemento de reconocimiento puede realizarse de diversas formas. El objetivo principal es permitir un contacto eficaz entre el elemento sensor y el transductor, manteniendo intacta la estabilidad y actividad de la biomolécula. Existen diversas publicaciones de gran calidad en la literatura describiendo las diferentes métodos de inmovilización del elemento sensor, de modo que se describen, de manera muy simplificada, los más importantes (ilustrados en la [Figura 1.13](#)):

- **Adsorción física:** el elemento de reconocimiento se pone en contacto con la superficie del transductor y en función del tiempo se adsorbe físicamente (por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) sobre el transductor. Aunque es un método muy sencillo, no permite una modificación ordenada del elemento de reconocimiento sobre el transductor, y, aleatoriamente, puede que la zona de reconocimiento no esté disponible para la formación del complejo.
- **Enlace covalente:** unión covalente entre el elemento de reconocimiento y la superficie activada del transductor por medio de grupos bifuncionales o espaciadores como

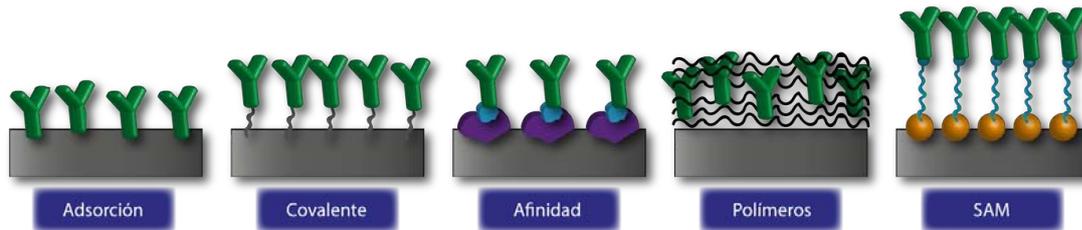


Figura 1.13: Métodos de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie de un transductor.

glutaraldehído, carbodiimida o silanización, entre otras. Aunque más complejo que otros métodos, suele permite obtener superficies sensoras más estables. Una de las últimas tendencias es la utilización de grupos diazonio para la modificación covalente de superficies transductoras<sup>42</sup>.

- **Unión de afinidad:** en este método se modifica el transductor con alguna especie que interaccione por afinidad con el elemento de reconocimiento (en alguna posición que no influya en su función biológica de reconocimiento). El sistema más utilizado es la modificación del transductor con estreptavidina y del elemento de reconocimiento con biotina, y tras su unión se forma la fase sensora en el transductor. Si el elemento de reconocimiento está funcionalizado con biotina en una posición fija determinada, se puede conseguir un transductor modificado con la fase sensora altamente localizada, dejando la posición reactiva más disponible para el reconocimiento molecular.
- **Atrapamiento polimérico:** el elemento de reconocimiento puede estar combinado con un polímero o membrana que se coloca sobre el transductor por adsorción física. El polímero o membrana puede funcionar como una barrera protectora para moléculas interferentes.
- **Monocapas autoensambladas:** son monocapas de un compuesto generadas espontáneamente sobre la superficie del transductor. Este compuesto tiene un extremo con alta afinidad por el material del transductor, mientras que el otro extremo deja libre un grupo funcional que puede interactuar con el elemento de reconocimiento (normalmente, formando un enlace covalente). Son típicas las monocapas autoensambladas de tioles sobre superficie de oro. Este método suele presentar menor adsorción inespecífica y un mejor control de la orientación del elemento de reconocimiento.

*Tipo de transductor*

Una de las clasificaciones más importantes de los biosensores se corresponde con el tipo de transducción que utilizan. Existen dos tipos posibles de transducción: química y física. En la transducción química, se determina el cambio en la composición química de la fase sensora en respuesta al proceso de reconocimiento. Este cambio puede determinarse directamente o con la ayuda de un reactivo secundario del proceso de reconocimiento. La transducción física mide el cambio en una propiedad física del sistema tras la reacción de reconocimiento. En general los tipos de transducción más importantes son los siguientes:

- **Óptica:** la transducción óptica se basa en la interacción de la radiación electromagnética con la materia (ya sea absorción, emisión (fluorescencia o fosforescencia), reflexión, refracción o dispersión de la luz que se puede relacionar con la reacción de reconocimiento).
- **Mecánica:** el reconocimiento molecular lleva consigo un cambio en la masa del sistema, que es detectado por este tipo de transductores. Este cambio de masa puede ser detectado con un sistema piezoeléctrico como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Este dispositivo se encuentra en vibración, y la propagación de esta vibración (por ondas acústicas de superficie) se ve afectada por la masa total del sistema. Otro tipo de transductor mecánico son los *microcantilevers*, que pueden producir una flexión al producirse la reacción de reconocimiento (esta flexión es proporcional a la masa del sistema, aunque también pueden utilizarse en modo de vibración como la QCM).
- **Térmica:** se basa en monitorizar el cambio en la temperatura producido por el calor de la reacción de reconocimiento. Solamente procesos catalíticos pueden generar suficiente calor para poder ser detectados.
- **Electroquímica:** en este caso, el transductor es de tipo electroquímico, por lo que es típicamente, un electrodo o sistema electródico. Este tipo de transducción por ser la utilizada durante esta Tesis Doctoral, se describirá en un próximo apartado.

### *Detección con o sin marca*

La detección en biosensores de afinidad puede llevarse a cabo de dos formas principales: sin marca o con marca<sup>6</sup>. En los biosensores sin marca, se mide un cambio en alguna propiedad física tras el reconocimiento molecular del analito en la superficie del transductor. En los biosensores con marca, se utiliza un reactivo secundario que es relacionado directa o indirectamente con la reacción de reconocimiento. Una marca puede consistir en especies luminiscentes, radioisótopos, enzimas cuyo producto enzimático sea detectable o especies electroactivas, entre otras. Como detección sin marca se podría utilizar la oxidación directa de aminoácidos de proteínas o de bases en los ácidos nucleicos o los cambios en propiedades superficiales medidos por impedancia, capacitancia o conductividad (en biosensores electroquímicos). Los biosensores con transducción por cambio de masa, como el QCM, son también sin marca. La técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) también es una técnica muy utilizada para desarrollo de biosensores sin marca.

Los biosensores con detección sin marca presentan algunas ventajas como por ejemplo: son dispositivos más simples, con menos gasto de reactivos (generalmente, sólo es necesario el sensor y la muestra) o el enlace de reconocimiento puede detectarse en tiempo real<sup>43</sup>. Su inconveniente más importante es la no posibilidad de distinguir entre interacciones específicas y no específicas excepto por la selectividad del elemento de reconocimiento, de modo que resulta en una selectividad menor que los ensayos con marca. Los biosensores con marca presentan otras ventajas como: una mayor sensibilidad con posibilidad de estrategias de amplificación, en general, mayor selectividad si se usa un reactivo secundario a la reacción de reconocimiento principal, ya que el analito es reconocido por dos especies diferentes (en un ensayo tipo *sandwich*). Como desventajas se encuentran los procedimientos experimentales más complejos para llevar a cabo los análisis, y la posibilidad de que al funcionalizar una biomolécula con una marca pierda parte de sus propiedades de enlace, haciendo la reacción menos eficaz, incluyendo una difusión más lenta hasta los sitios de enlace (por el mayor tamaño del conjugado marca-biomolécula).

### *Formatos de biosensores*

Los biosensores, especialmente los inmunosensores y genosensores, pueden ser diseñados de diferente forma que pueden ofrecer ventajas en la detección y la sensibilidad del

---

<sup>6</sup> Los biosensores catalíticos son eminentemente sin marca, ya que la reacción enzimática se puede detectar de manera directa o indirecta por la detección de un producto. Por tanto, cuando se describan sensores con marca o sin marca, se estará haciendo referencia a biosensores de afinidad.

sistema. A continuación, se describen algunos de los formatos más utilizados en inmuno-sensores (Figura 1.14), con la diferencia entre si el antígeno o el anticuerpo de captura es inmovilizado en la superficie del transductor:

#### ANTICUERPO INMOVILIZADO

En los tres primeros formatos, el anticuerpo es inmovilizado en el transductor y funciona como elemento de reconocimiento del sensor:

- **Formato A:** el antígeno de la muestra compite por los sitios de unión del anticuerpo con el mismo antígeno funcionalizado con una marca de detección (ensayo competitivo). Cuanta mayor concentración de antígeno exista en la muestra, menor cantidad de antígeno marcado reacciona, y la detección producirá una menor respuesta (inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra). Es un formato muy utilizado para antígenos pequeños, que solamente poseen un sitio de unión.
- **Formato B:** este es un formato tipo *sandwich*, donde el antígeno reacciona con el anticuerpo de la fase sensora y a continuación, un anticuerpo secundario marcado reacciona por otro sitio de unión del antígeno. Este formato mejora la selectividad del sistema, ya que el antígeno tiene que ser reconocido por los dos anticuerpos para producir una respuesta, pero el antígeno debe poseer al menos dos epitopos para su unión con dos anticuerpos. Un ensayo muy conocido de este tipo es el llamado *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).
- **Formato C:** en este formato el antígeno reacciona con el elemento de reconocimiento directamente, y esta reacción se monitoriza mediante una detección sin marca, como se explicó anteriormente.

#### ANTÍGENO INMOVILIZADO

- **Formato D:** el antígeno inmovilizado en la fase sensora y el antígeno de la muestra compiten por los sitios de unión de un anticuerpo marcado (ensayo competitivo). Al haber mayor concentración de antígeno en la muestra, reacciona en mayor medida con el anticuerpo marcado en disolución, y menos anticuerpo estará disponible para reaccionar con la fase sensora. Por esa razón, la respuesta final será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.
- **Formato E:** este es un formato tipo *sandwich*, pero con el fin de detectar anticuerpos. La fase sensora compuesta por el antígeno reacciona con el anticuerpo específico de

la muestra, y a continuación, un anticuerpo secundario marcado reacciona con ese anticuerpo para llevar a cabo la detección de la reacción inmunológica.

- **Formato F:** este formato es similar al formato C, pero el anticuerpo en disolución, que es la especie de interés, es el que reacciona con el antígeno inmovilizado. La respuesta del sensor se obtiene sin utilizar una marca de detección.

Cabe destacar que existen algunas variaciones en estos formatos, según se utilicen unos tipos de reactivos u otros (incluso utilizando un tercer anticuerpo en el formato B, o la marca de detección funcionalizada puede añadirse en un paso posterior). Otro aspecto a destacar, es que los biosensores en general, y especialmente los inmunosensores, pueden sufrir adsorciones inespecíficas de especies que produzcan una señal falsa, por la unión de una especie en un sitio no específico de unión de la reacción inmunológica (por ejemplo, en la superficie física del dispositivo). Para minimizar este problema, el sensor, generalmente, se expone a un agente bloqueante antes de realizar el ensayo. Esta especie, normalmente una proteína inerte, bloquea los sitios de unión no específicos y elimina la posibilidad de producir una señal falsa. Una desventaja de este proceso es que complica el procedimiento total del inmunoensayo y aumenta el tiempo total de análisis.

Aunque en la mayoría de formatos, la respuesta es lineal con el grado de formación del complejo analito-receptor, en los formatos competitivos, la respuesta es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. La representación de las curvas de calibrado en este caso no es lineal, sino que la señal es función del logaritmo de la concentración de analito, tiene forma sigmoidal y puede ajustarse a la ecuación 1.4, donde  $A_{max}$  es la máxima asíntota correspondiente a la señal en ausencia de analito,  $b$  es el valor de la pendiente de la curva en el punto de inflexión,  $EC_{50}$  es la concentración de analito en el punto de inflexión (concentración correspondiente al 50 % de la inhibición respecto a  $A_{max}$ ) y  $A_{min}$  es la asíntota mínima que corresponde a la señal en exceso de analito. Cuanto mayor es la constante de afinidad del complejo, menor es el valor de  $EC_{50}$ . El intervalo dinámico viene dado como el intervalo de concentraciones que produce una señal entre el 80 y el 20 % del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima. El LOD se calcula como la concentración de analito que origina una disminución de la señal de un 10 % respecto al blanco.

$$s_n = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[analito]^b}{EC_{50}}\right)} + A_{min} \quad (1.4)$$

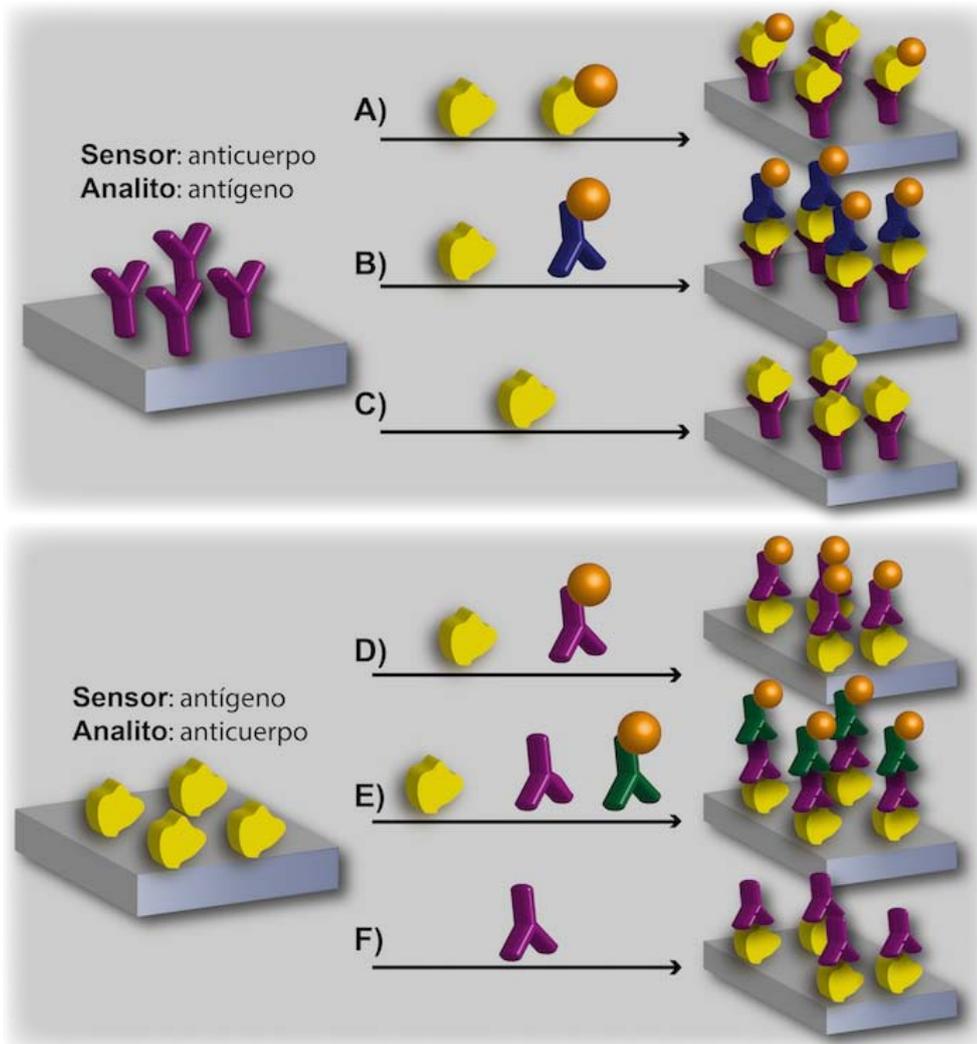


Figura 1.14: Formatos de inmunosensores más utilizados.

### 1.2.1 Biosensores electroquímicos

Los transductores electroquímicos presentan ciertas ventajas frente a otro tipo de transducción como por ejemplo, la relativa simplicidad y el bajo coste de los dispositivos e instrumentación de lectura, facilidad de uso o su posible portabilidad<sup>44</sup>. La portabilidad puede permitirles su uso como dispositivos POC con instrumentos de mano. Además, la señal obtenida es eléctrica y, en consecuencia, se puede realizar la transducción directa al sistema electrónico de registro. Básicamente, un sensor electroquímico se compone de un circuito eléctrico que puede ser fácilmente miniaturizado y su coste de producción suele ser bajo. Esto permite su utilización para la monitorización *in situ* en diferentes aplica-

ciones. La sensibilidad de los métodos electroquímicos es independiente al volumen de muestra, por lo que se pueden utilizar bajos volúmenes<sup>45</sup>, y cierta selectividad puede ser conseguida al ajustar las condiciones de excitación y obtención de la respuesta electroquímica. La detección puede hacerse en disoluciones turbias o coloreadas, como por ejemplo, sangre<sup>46</sup>, algo que excluiría a la transducción óptica. Aunque con características muy prometedoras, los biosensores electroquímicos todavía no están en disposición para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades clínicas en hospitales o centros médicos. Algunas razones incluyen la relativamente difícil automatización de estos dispositivos o problemas en la estabilidad de los elementos sensores. Sin embargo, una comunidad científica muy extensa se encuentra trabajando en el desarrollo de dispositivos analíticos de diagnóstico y estos problemas podrían ser resueltos en los próximos años de manera eficiente.

Una introducción a la electroquímica dinámica y algunas técnicas electroquímicas viene dada en la [Sección 1.4](#), mientras que a continuación se trazan las ideas generales de los diferentes métodos de transducción en biosensores electroquímicos:

- **Transducción voltamperométrica:** se basa en la aplicación de un barrido de potenciales y el registro de la corriente generada en función del potencial aplicado. Al producirse una reacción redox, la corriente aumenta (en términos absolutos) de manera proporcional a la concentración de analito en la muestra.
- **Transducción potenciométrica:** se basa en la medida del potencial de equilibrio en una membrana permselectiva (potencial de membrana) que separa dos disoluciones. La membrana es selectiva al analito por lo que se trasladará desde la zona de mayor concentración a la de menor concentración hasta un estado de equilibrio. Este cambio producirá un cambio en el potencial de membrana que será proporcional a la concentración de especie en la disolución. Los electrodos selectivos de iones (ISE) son el ejemplo más significativo de este tipo de transducción.
- **Transducción amperométrica:** se basa en la medida de la corriente generada en función del tiempo tras la aplicación de un potencial constante (o saltos de potencial constante). El potencial aplicado suele ser característico de la especie de interés (algo que contribuye a mejorar la selectividad del sistema ya proporcionada por el sistema de reconocimiento). La corriente medida a un tiempo determinado es proporcional a la concentración de analito. Tanto el sensor de glucosa comercializado en la actualidad como el sensor de O<sub>2</sub> y glucosa inventados por Clark se basan en transducción amperométrica.

- **Transducción impedimétrica:** se basan en la medida del cambio de la impedancia (por las propiedades resistivas y capacitivas de los materiales) en una celda en la que se produce un proceso faradaico (transferencia electrónica entre una especie y el electrodo) tras la aplicación de un potencial de corriente alterna de excitación de pequeña amplitud. La impedancia indica la oposición al flujo de una corriente alterna a través de la celda electroquímica. Puede ofrecer información sobre la celda electroquímica como la migración iónica, distribución de cargas en la interfase electrodo/disolución y la velocidad de la transferencia electrónica. Estas propiedades pueden estar relacionadas con un elemento sensor integrado en el dispositivo. El elemento sensor y el analito, especies biológicas en los biosensores típicos, se encuentran modificando la superficie del electrodo y pueden influir de diferente manera (normalmente, de manera negativa) en la transferencia electrónica entre una especie redox en disolución y el electrodo, ya que funcionan como una barrera física, ya sea por motivos estéricos o electrostáticos. Más información sobre la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica viene dada en la [Sección 1.4](#).
- **Transducción capacitiva:** se basa en los cambios en la capacitancia de la interfase transductor/disolución como resultado del proceso de reconocimiento. La doble capa eléctrica formada en la interfase electrodo/disolución puede ser considerada como un condensador (más detalles en la [Sección 1.4](#)) que almacena carga. El electrodo transductor puede considerarse como una placa del condensador y la disolución de electrolito como otra placa. El elemento sensor hace la función del dieléctrico que al producirse el proceso de reconocimiento cambia y la distancia entre placas del condensador aumenta progresivamente, y también su capacitancia<sup>47</sup>. Una celda de dos electrodos puede ser utilizada para este tipo de transducción, lo que simplifica el dispositivo sensor. La medida del cambio de la capacitancia puede hacerse mediante medidas de impedancia no faradaica (sin proceso redox), ajustando la respuesta a un circuito equivalente que contiene la resistencia de la disolución y la capacitancia del condensador en serie. Otro método de medida consistiría en la aplicación de un cambio brusco al potencial de la celda (pero menor de 50 mV). La redistribución iónica en la doble capa eléctrica induce una corriente variable con el tiempo que depende de la capacitancia según la ecuación 1.5, donde  $\Delta E$  es el potencial aplicado,  $R_s$  la resistencia de la disolución y  $C_{dl}$  la capacitancia de la doble capa.

$$i(t) = \frac{\Delta E}{R_s} \exp\left(\frac{-t}{R_s C_{dl}}\right) \quad (1.5)$$

- **Transducción conductimétrica:** se basa en la medida del cambio de conductividad local del medio después de que se ha producido la reacción de reconocimiento (por la generación de algún producto cargado, por ejemplo). Típicamente, el sistema comprende dos electrodos similares colocados en paralelo con una disolución (y el elemento sensor) confinada entre ellos. Biosensores basados en transducción conductimétrica pueden ser muy simples (sistema de dos electrodos), de bajo coste y no requieren de electrodo de referencia. Aunque desde un punto de vista analítico, las medidas directas de conductividad no tienen selectividad ya que cualquier ion puede cambiar la respuesta.
- **Transducción FET:** un transistor de efecto de campo (FET) es un dispositivo semiconductor que posee tres terminales: puerta (gate), drenador (drain) y fuente (source). De forma muy simplificada, en estos dispositivos la aplicación de un campo eléctrico controla la conducción eléctrica entre los terminales drenador y fuente. En un biosensor FET, el elemento sensor se suele colocar en la puerta, por lo que tras la reacción de reconocimiento, la distribución de cargas en este terminal cambia causando una variación del campo eléctrico en el semiconductor.

Previamente, ya se han descrito las principales propiedades de los electrodos serigrafados y sus ventajas e inconvenientes generales. Teniendo en cuenta esas ventajas como el bajo coste, carácter desechable, bajo volumen de muestra requerido, miniaturización y portabilidad, parece claro que son una herramienta muy interesante como transductor electroquímico de biosensores. Sus propiedades se ajustan bien a la necesidad de llevar a cabo análisis rápidos con dispositivos portátiles en el lugar de recogida de muestra. Los biosensores desechables basados en SPÉs han conducido a nuevas posibilidades en la detección y cuantificación de biomoléculas, pesticidas, antígenos, ADN, microorganismos, enzimas o células. Un artículo de revisión relativamente reciente fue publicado en 2014 describiendo los últimos avances en el uso de electrodos serigrafados para biosensores (enzimáticos, genosensores, aptasensores o inmunosensores), con un total de 226 referencias. Esto demuestra la popularidad de este tipo de electrodos, y la difícil descripción de todas sus aplicaciones. Por esta razón, a continuación solamente se reseñan algunos trabajos que demuestran, a grandes rasgos, su utilidad como biosensores electroquímicos. Estos electrodos se han utilizados como inmunosensores para la detección de analitos tan importantes como la  $\beta$ -amiloide, biomarcador de la enfermedad de Alzheimer<sup>48</sup>, o de especies alérgicas como la Ara h 1<sup>49</sup>. Interesantemente, dispositivos con dos electrodos

de trabajo mostraron la utilidad para llevar a cabo dos inmunosensores con detección simultánea de dos biomarcadores del cáncer de próstata<sup>50</sup> o de la enfermedad celíaca<sup>7</sup>. Los SPEs han mostrado un gran comportamiento en genosensores. La posibilidad de utilizar electrodos serigrafiados de oro<sup>51</sup> o con nanopartículas de oro<sup>52</sup>, permite una funcionalización muy eficiente de hebras de ácidos nucleicos con grupos SH. Incluso ha sido posible la construcción de biosensores para la detección de microARNs<sup>53</sup>, que están teniendo una creciente importancia como biomarcadores de enfermedades. Por otro lado, membranas nanoporosas han sido acopladas a la superficie de electrodos serigrafiados, realizando el bioensayo entre los poros del material. El bloqueo de los poros por el reconocimiento biológico inhibe la difusión de una especie electroactiva indicadora de manera proporcional a la cantidad de analito y, por tanto, su contacto íntimo con la superficie del electrodo serigrafiado para la transferencia electrónica<sup>54,55</sup>.

### 1.2.2 *Marcas de biosensores electroquímicos*

Como ya se introdujo anteriormente, una buena parte de los biosensores desarrollados necesitan una marca de detección para determinar el grado de reacción de la formación del complejo y presentan algunas ventajas e inconvenientes en comparación a la detección directa (sin marca). En los biosensores electroquímicos ocurre lo mismo.

Los biosensores electroquímicos sin marca pueden hacer uso de diferentes estrategias para detectar la reacción de reconocimiento biológica. Ya se han explicado la transducción capacitiva y conductimétrica que es eminentemente una detección sin marca. La transducción por impedancia faradaica, aunque necesita de una especie electroactiva, esta especie no está unida a ninguna de las especies que forman el complejo de reconocimiento, por lo que podría también considerarse un método sin marca. El otro método posible de detección sin marca es la oxidación o reducción directa de algún componente del sensor que pueda relacionarse con la concentración de analito en la muestra. Por ejemplo, en genosensores, puede utilizarse la oxidación directa de guanina o adenina, que son las bases más electroactivas (aparecen alrededor de +1.0 y +1.3 V en electrodos de carbono)<sup>56</sup>. Cuando la hibridación no se ha producido la oxidación de estas especies es más fácil que cuando se produce la formación de la doble hebra, por lo que se puede monitorizar la reacción. Otro ejemplo es la oxidación directa de algún aminoácido de ciertas proteínas para su detección, aunque suelen ser transferencias electrónicas muy lentas.

El requerimiento para ciertas aplicaciones de desarrollar dispositivos analíticos muy sensibles, especialmente en diagnóstico clínico, donde la detección precoz de enfermedades necesita de la cuantificación de pequeñas concentraciones de biomarcadores, convierte casi en obligación la utilización de marcas de detección en los biosensores de afinidad, y además, de diversas estrategias de amplificación. Existen diferentes tipos de marcas electroquímicas, entre las que destacan las marcas enzimáticas, marcas electroactivas directas, o las nanopartículas (que, por la importancia en esta Tesis, serán descritas en el siguiente apartado).

Las marcas electroactivas directas consisten en la funcionalización de algún componente de la reacción de reconocimiento con una especie que pueda ser oxidada o reducida fácilmente. Algunas marcas de este tipo pueden ser el dinitrofenol, ferroceno, complejos de oro(I), el hexaaminrutenio que se une a hebras de ADN. La fácil medida directa de estas especies es su mayor ventaja pero, normalmente, no permite una gran amplificación a no ser que se utilicen en sistemas de unión más complejos.

Las ventajas de las marcas enzimáticas se basan principalmente en la capacidad de la reacción enzimática de catalizar la generación de un producto a lo largo del tiempo y por tanto, de obtener un cierto grado de amplificación, con unos resultados muy interesantes en términos de sensibilidad (y límites de detección). Existen numerosas enzimas que pueden ser utilizadas con diferentes estrategias de detección electroquímica como por ejemplo:

- detección de la enzima directamente, que involucra la transferencia electrónica entre el centro redox de la enzima y el electrodo. Esta transferencia es difícil, por lo que se suele introducir alguna especie capaz de funcionar como cable conductor y transferir electrones entre la enzima y el electrodo.
- la reacción enzimática genera un producto electroactivo que es medido en el electrodo.
- el intermedio enzimático puede reaccionar con un mediador redox externo cuyo producto es electroactivo y que, normalmente, se mide a un potencial muy bajo (cercano a cero).

Las enzimas más utilizadas en biosensores electroquímicos son la fosfatasa alcalina (AP), la peroxidasa del rábano silvestre (HRP) o la glucosa oxidasa (GOx). Una metodología muy interesante para aumentar la sensibilidad es la generación de un producto sólido de

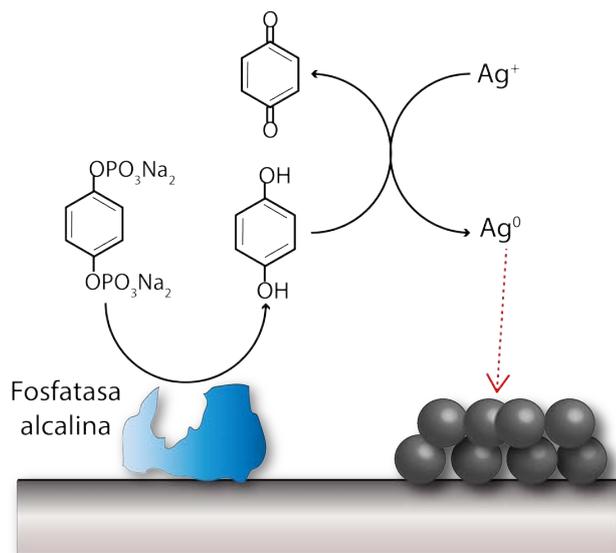


Figura 1.15: Preconcentración de plata sobre la superficie electroquímica tras una reacción enzimática de la fosfatasa alcalina.

la reacción enzimática que se preconcentra en la superficie del electrodo y que, además, es electroactivo. La preconcentración en la superficie electroquímica permite una detección más sensible ya que una elevada cantidad de la especie se encuentra en íntimo contacto con el electrodo, lo que produce una señal amplificada. Una interesante estrategia fue publicada por Neves et al.<sup>57</sup> en la que se usa AP para catalizar la reacción de desfosforilación de la hidrocina difosfato en presencia de iones plata que son reducidos por la hidrocina generada en la reacción enzimática. La  $Ag$  elemental generada, un producto sólido, es preconcentrado en la superficie electroquímica, mejorando la detección electroquímica. Un esquema de esta estrategia se muestra en la [Figura 1.15](#). Como desventaja de las marcas enzimáticas se encuentran que son proteínas delicadas y que pueden perder su función biológica si no se encuentran en su medio óptimo, por ejemplo con un cambio en la temperatura, pH, concentración y tipo de sales o disolventes. Aunque existen métodos para estabilizar enzimas (ver por ejemplo, una excelente revisión en Chem. Soc. Rev.<sup>58</sup>) o las tecnologías sintéticas están mejorando sus propiedades, el desarrollo de otras marcas con posibilidades de amplificación, mayor estabilidad y menor coste es una preocupación constante.

### 1.2.2.1 Nanopartículas como marca electroquímica

Aunque en apartados posteriores se describirán los principios de la nanotecnología y las propiedades de los nanomateriales, a continuación se describen las marcas electroquímicas de biosensores usando nanopartículas (NPs). Las nanopartículas presentan ciertas características que las hacen muy interesantes para su funcionalización con una biomolécula de reconocimiento secundario y su uso en biosensores electroquímicos. Entre estas características destacan la biocompatibilidad, la cantidad de métodos de síntesis sencillos y rápidos descritos para multitud de nanopartículas, algunas de ellas presentan una excelente electroactividad y pueden ser recubiertas eficientemente de biomoléculas (con un buen recubrimiento). Además, presentan una mayor estabilidad en comparación a las enzimas, ofrecen una alta sensibilidad (una NP se compone de numerosos átomos capaces de generar una señal electroquímica), y la amplia variedad de nanopartículas abre la puerta a ensayos multianálisis. Incluso han sido utilizadas como vehículos que contienen una cantidad elevada de marcas electroactivas, con el aumento de sensibilidad que eso conlleva. Por esta razón, han sido ampliamente empleadas como marca de biosensores electroquímicos en los últimos 15 años, desde que se describió el uso de nanopartículas de oro<sup>59</sup>. Existen una cantidad muy elevada de publicaciones describiendo nanopartículas utilizadas como marca electroquímica, pero las más utilizadas podrían ser las siguientes: nanopartículas de oro (AuNPs), nanopartículas de plata (AgNPs), quantum dots (QDs), otras nanopartículas metálicas (especialmente, platino (PtNPs) o paladio (PdNPs)), liposomas, apoferritinas o nanopartículas de sílice. Estos dos últimos tipos de nanopartículas permiten la introducción en su especial estructura de otras especies electroactivas que pueden funcionar como marca, obteniendo una estructura híbrida con multitud de marcas, hecho que genera una señal amplificada.

Existen diferentes formas en que las nanopartículas pueden ser detectadas por métodos electroquímicos, según sean sus propiedades, las más frecuentes (especialmente para nanopartículas metálicas y QDs) se muestran en el esquema de la [Figura 1.16](#) y se describen a continuación:

- las nanopartículas se digieren en un medio ácido fuerte para liberar sus especies electroactivas a la disolución, que son medidas a continuación. Las más usadas con este método de detección son nanopartículas metálicas de oro y plata, y los quantum dots.

- mediante la detección directa del componente electroactivo. Por ejemplo, nanopartículas de oro o plata se pueden oxidar en primer lugar para generar los metales en disolución, que luego son preconcentrados por el método de redisolución anódica. Sin embargo, por la alta estabilidad de las nanopartículas metálicas, necesitan estar en contacto cercano con el electrodo (detección en estado sólido), y un sobrepotencial elevado debe ser aplicado para producir este proceso de manera eficaz, por lo que el rendimiento no es muy bueno. En el caso de los QDs, en los defectos superficiales pueden encontrarse átomos del metal que pueden ser reducidos y redisueltos de manera directa. Sin embargo, este tipo de átomos son una minoría en la estructura, además de que los defectos podrían ser bastante aleatorios en diferentes nanopartículas. La ventaja de este método de detección es que se evita la utilización de un ácido fuerte, y es un método más simple que el caso anterior.
- detección de un metal tras su reducción catalítica (y posterior reoxidación) sobre una nanopartícula metálica, en inglés llamado *enhancing*. Este proceso puede hacerse mediante métodos químicos utilizando una disolución específica o mediante métodos electroquímicos. El depósito generado es de mayor tamaño que la nanopartícula y, por tanto, aumenta la sensibilidad en la detección. Sin embargo, este proceso solamente ha sido descrito en muy pocos casos como la reducción de Cu y Ag sobre AuNPs o de Ag sobre AgNPs.
- detección mediante la catálisis de una reacción electroquímica favorecida por la presencia de la nanopartícula. Algunos ejemplos pueden ser la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidrazina usando PtNPs, p-nitrofenol usando AuNPs, o por el incremento de la reacción de reducción de protones en presencia de AuNPs.

Una de las tendencias en el desarrollo de sensores es la **multidetección simultánea**, por el ahorro de coste, tiempo de análisis y menores volúmenes de muestra necesarios. Esta multidetección puede ser proporcionada por el diseño del dispositivo, como se comentó en los multielectrodos serigrafados o bien puede ser proporcionada por detección química múltiple en un dispositivo convencional. La multidetección de este tipo se llama multianálisis (*multiplexing*) y se basa en la detección de dos o más analitos en la misma muestra utilizando diferentes marcas de detección (como en el ejemplo general de la [Figura 1.17](#)). Este tipo de detección aunque puede ser conseguido con otro tipo de marcas (por ejemplo, luminiscentes), las marcas electroquímicas son ideales por la numerosa cantidad de especies electroactivas que pueden ser medidas simultáneamente con alta resolución.

## Detección electroquímica de nanopartículas

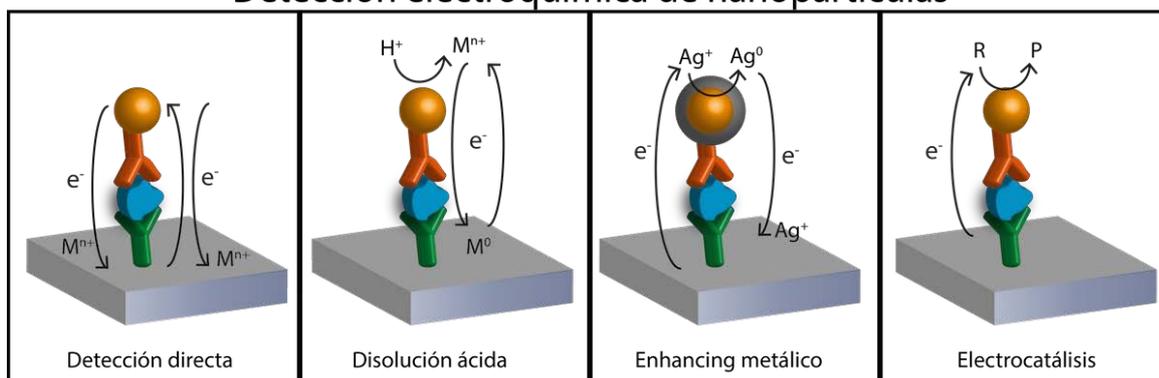


Figura 1.16: Principales tipos de detección electroquímica de nanopartículas funcionando como marca.

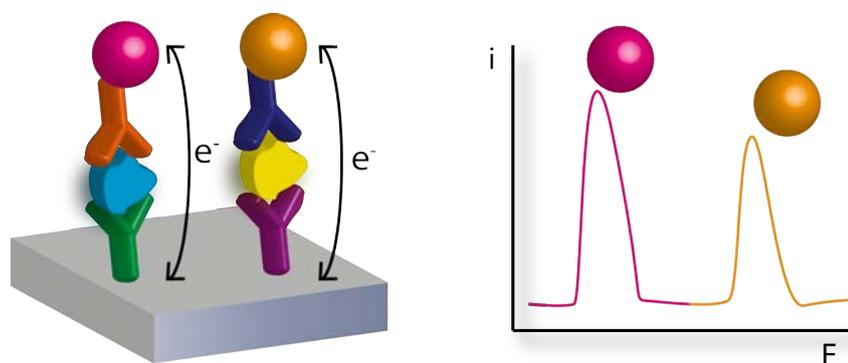


Figura 1.17: Esquema simplificado de la multidetección electroquímica de dos nanopartículas diferentes.

El caso más típico de este tipo de marcas son los QDs, nanopartículas semiconductoras que pueden estar fabricadas con diferentes metales electroactivos (se describirán en mayor medida en el [Sección 1.3.2](#)).

#### BIOFUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Como se ha descrito anteriormente, las nanopartículas han demostrado proporcionar interesantes y novedosas características en aplicaciones de biosensores. Para su uso como marcas de detección en biosensores, en la mayoría de los casos, deben estar previamente unidas a una molécula biológica de interés a través de una modificación superficial. Por ese motivo, diferentes técnicas de biofuncionalización de nanopartículas han sido desarrolladas en los últimos años. Una característica importante de las nanopartículas, por su elevada área superficial, es la posibilidad de unir gran número de moléculas biológicas (aunque esto dependerá del tamaño y naturaleza de ambos reactivos). Existen dos clases

principales de biofuncionalización de nanopartículas: por enlace covalente y por interacción no covalente (ver [Figura 1.18](#)). A continuación, se describen, muy brevemente, los métodos más utilizados para la biofuncionalización de nanopartículas:

- **Interacción electrostática:** es una forma de adsorción, que se produce ya que las NPs, normalmente, están estabilizadas por algún ligando aniónico con grupos carboxilos, citrato, tartrato, etc. que pueden ser enlazados a las cadenas de aminoácidos cargadas positivamente de las biomoléculas por simple interacción electrostática.
- **Interacción hidrofóbica (*pi-pi stacking*):** este método es típico de nanomateriales de carbono que pueden interaccionar por medio de apilamiento *pi-pi* con otras moléculas aromáticas (como pirenos, porfirinas, etc.).
- **Atrapamiento polimérico:** las nanopartículas pueden ser atrapadas en una película polimérica biocompatible que tengan grupos funcionales que pueden ser unidos a otras moléculas posteriormente, como por ejemplo, usando polietilenglicol, Nafion, chitosan.
- **Interacciones de afinidad:** consiste en utilizar una reacción de afinidad para unir la NP a la biomolécula de interés. Sin embargo, este se considera un método secundario de funcionalización ya que anteriormente la NP debe estar unida a uno de los reactivos que se involucran en la reacción de afinidad por alguno de los otros métodos disponibles. La reacción de afinidad más utilizada para este tipo de funcionalización es el complejo avidina-biotina, que será descrito en un apartado posterior.
- **Enlace covalente:** esta metodología tiene una ventaja en términos de estabilidad y reproducibilidad de la biofuncionalización y disminuye la adsorción física no específica. Una desventaja podría ser que la reacción covalente podría afectar a la funcionalidad de la biomolécula. Los tres tipos más importantes de funcionalización covalente de nanopartículas son los siguientes: 1) reacción directa mediante los grupos funcionales de la superficie de la NP, enlazados directamente a los ligandos reactivos (por ejemplo, nanomateriales con grupos -COOH pueden enlazarse a aminas primarias de las proteínas), en algunos casos se hace uso de catalizadores como la NHS, capaz de generar un intermedio más reactivo<sup>60</sup>; 2) por enlace con entrelazantes bifuncionales, ya que, en algunos casos, la reacción directa a un soporte sólido (nanopartículas) podría causar la desnaturalización de la biomolécula, el método más común es la amidación mediada por la carbodiimida<sup>61</sup>, en ocasiones

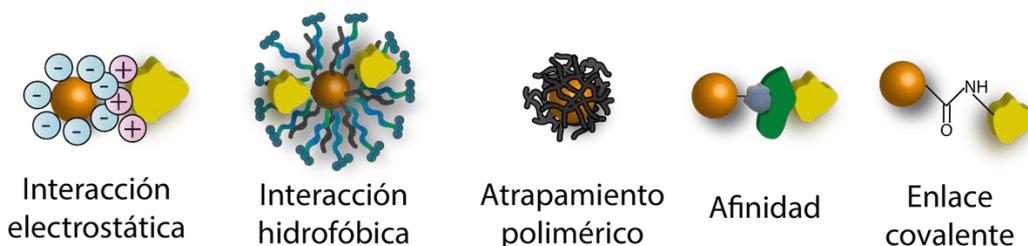


Figura 1.18: Diferentes formas de funcionalización de nanopartículas con especies biológicas.

unida con la NHS para catalizar la reacción; 3) mediante *click-chemistry*, que consiste en una cicloadición de grupos azida o alquinos catalizada por cobre.

Más información sobre métodos de funcionalización de nanopartículas se puede encontrar en la excelente revisión publicada por Medintz et al.<sup>62</sup> o en el libro titulado “*Biofunctionalization of nanomaterials*”<sup>63</sup>.

### 1.2.3 Modelos de biosensores estudiados

En este apartado se describen las características más importantes de los dos sistemas biosensores utilizados durante esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se describe la reacción de afinidad biotina-avidina, y en segundo lugar, la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca.

#### 1.2.3.1 Biotina-avidina

La alta interacción específica entre la avidina (y especies derivadas) y la biotina es una herramienta muy importante para diseñar métodos de purificación y sistemas de biosensores. La biotina es una vitamina de 244 Da de peso molecular (ver estructura en la [Figura 1.19](#)), también llamada Vitamina H, B7 o coenzima R, que se encuentra en pequeñas cantidades en células vivas y tiene una función crítica en algunos procesos de crecimiento celular o en el ciclo del ácido cítrico. La avidina es una proteína que se encuentra en la clara de los huevos de ciertas aves, reptiles y anfibios. La avidina de pollo tiene un peso molecular de 68 kDa y está formada por cuatro subunidades de aminoácidos, que cada una puede enlazar a una molécula de biotina (en total, la avidina enlaza cuatro moléculas de biotina). Su estructura presenta un 10% de carbohidratos que contribuyen a un punto isoeléctrico básico (sobre 10) y una alta solubilidad en disoluciones acuosas. Sus dos variantes más importantes son la estreptavidina y la neutravidina, que también son

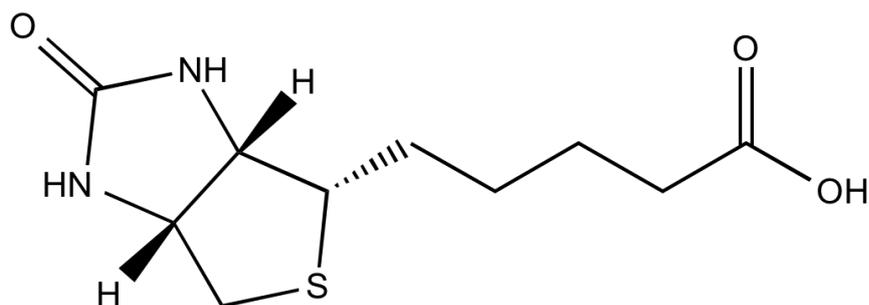


Figura 1.19: Estructura de la biotina.

capaces de unir a la biotina. La estreptavidina es una proteína que se obtiene de la bacteria *Streptomyces avidinii* con un peso molecular de 60 kDa. Su estructura es muy similar a la avidina, aunque no presenta carbohidratos y su pI es 5, por lo que es algo menos insoluble que la avidina. En consecuencia, la disminución de los carbohidratos puede resultar en una unión no específica menor que utilizando avidina. La desventaja es su mayor coste de producción. La neutravidina es una proteína de 60 kDa, que elimina los inconvenientes de la avidina y la estreptavidina, pero manteniendo una afinidad muy alta frente a la biotina. También presenta una menor unión no específica, pero con un coste más bajo que la estreptavidina. La más utilizada en la actualidad es la estreptavidina.

La interacción entre la biotina y las avidinas (biotina-estreptavidina en la [Figura 1.20](#)) es la interacción no covalente más fuerte que se conoce entre una proteína y un ligando, ya que presenta una constante de disociación muy baja ( $K_d = 10^{-15}$  M). Ambas especies pueden ser unidas a biomoléculas o incluso a nanopartículas, por lo que su uso en diferentes aplicaciones bioanalíticas está muy extendido. Su función principal es hacer de puente entre una biomolécula y una marca de detección. Por ejemplo, marcas de detección funcionalizadas con estreptavidina pueden unirse a un reactivo secundario (o incluso primario) de la reacción de reconocimiento en un biosensor. También podría ocurrir al contrario que el reactivo secundario estuviera funcionalizado con estreptavidina y la marca de detección con biotina, aunque existen una mayor cantidad de reactivos biológicos funcionalizados con biotina en el mercado (o *kits* para llevar a cabo su biotinilación). La interacción biotina-avidina también se utiliza para llevar a cabo la modificación de la superficie de un transductor con el elemento de reconocimiento como se mencionó anteriormente.

La detección de biotina<sup>64,65</sup> o de la proteína<sup>59,66</sup> suele ser una aplicación interesante en biosensores o bioensayos electroquímicos que utilizan la reacción biotina-estreptavidina, normalmente en ensayos competitivos, por el pequeño tamaño de la biotina que solamente

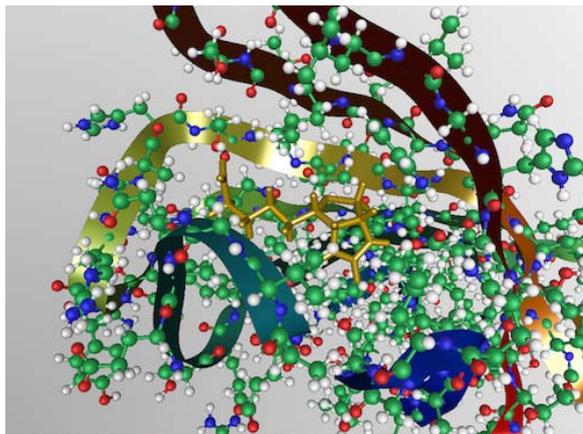


Figura 1.20: Estructura tridimensional de la estreptavidina unida a la biotina. Estructura obtenida del *RCSB Protein Data Bank* y representada con el software *iMol*.

posee un sitio de unión. La estreptavidina también puede unirse a materiales magnéticos que son utilizados para hacer la reacción de afinidad sobre la superficie del material y poder ser separados de los reactivos que no han reaccionado<sup>67</sup>. Además, permiten la pre-concentración en el electrodo de trabajo con el aumento de la sensibilidad en la detección. Aunque las mayores aplicaciones que tiene la interacción biotina-estreptavidina dentro de los biosensores electroquímicos es la funcionalización del elemento biológico ya sea con biotina o estreptavidina para su unión con la marca de detección (funcionalizada con el reactivo contrario). Por otro lado, una estrategia interesante es la utilización de esta reacción de afinidad para evaluar el desarrollo de algún elemento de un biosensor, como una nueva marca o una nueva forma de detección, antes de comprobar el nuevo sistema con un biosensor más complejo. La formación del enlace es muy rápido, le afecta poco los cambios de pH, temperatura o agentes desnaturizantes, y en consecuencia es un gran sistema modelo para el desarrollo de nuevas formas de detección en biosensores, como se ha utilizado en esta Tesis Doctoral.

#### 1.2.3.2 *Enfermedad celíaca*

La enfermedad celíaca (EC)<sup>68,69</sup> es una enteropatía autoinmune producida por la intolerancia al gluten en individuos de todas las edades genéticamente predispuestos. Un efecto de la EC es la generación de autoanticuerpos que causan la destrucción de la mucosa intestinal. El cuadro clínico difiere en función de la edad, se puede presentar desde formas clínicas muy severas a formas totalmente asintomáticas, que pueden retrasar el diagnóstico, aunque el organismo se va deteriorando con el paso del tiempo y un diagnóstico

tardío está relacionado con complicaciones en la enfermedad. Desafortunadamente, un alto porcentaje de las personas que sufren la EC no están diagnosticadas. Aunque existen tratamientos experimentales muy prometedores, el único tratamiento disponible hasta ahora es una dieta libre de gluten. La adherencia a la dieta disminuye el riesgo de las complicaciones hasta igualarse con la población general. Por tanto, el diagnóstico temprano de la EC cuando los pacientes tienen pocos o ningún síntoma es muy importante y puede ayudar a mejorar la calidad de vida del paciente. En estos casos, una biopsia del intestino delgado, que es el método más exacto de detección, está completamente descartado, y los análisis séricos deberían ser clave para un diagnóstico temprano. La mejora de la eficacia (y coste) en los análisis de sangre para detectar la enfermedad celíaca podría permitir un *screening* exhaustivo de la población, y por tanto, poder tratar rápidamente a pacientes no diagnosticados de la EC con la implementación de una dieta sin gluten tan pronto como posible. Sin embargo, este tipo de programas no suelen realizarse porque, en la actualidad, los análisis rutinarios son demasiado caros, y la administración no puede permitirse este coste para un espectro amplio de la población. Por esta razón, el desarrollo de dispositivos analíticos de bajo coste que puedan ser utilizados en este tipo de programas podría ser un avance importante.

Como se comentó anteriormente, la biopsia del intestino delgado está todavía considerado como el método de referencia para el diagnóstico de la EC, pero los ensayos serológicos para la detección de biomarcadores<sup>7</sup> de la enfermedad están siendo de excelente ayuda para evitar los métodos más invasivos. En la actualidad, el principal biomarcador de la enfermedad celíaca es la detección de anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular (tTG). Específicamente, el análisis rutinario que se realiza en los hospitales es la detección de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa (anti-tTG IgA), ya que son los más específicos a la EC. Sin embargo, cuando un paciente tiene deficiencia de anticuerpos IgA se recomienda la detección de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa (anti-tTG IgG), algo importante ya que muchos pacientes de EC presentan deficiencia de IgA<sup>68,69</sup>. La monitorización de estos biomarcadores puede también resultar útil tras el diagnóstico y adherencia a una dieta libre de gluten para evaluar si este tratamiento está funcionando, ya que sus niveles suelen disminuir. El anti-tTG IgA posee una sensibilidad de 95.2 %, una especificidad de 97.9 %, un valor predictivo positivo de 96.9 % y un valor predictivo negativo de 96.8 % en pacientes con alto riesgo de EC, mientras que estos valores son algo más bajos en pacien-

---

<sup>7</sup> Un biomarcador es una especie con función biológica, una expresión o actividad que causa o es específicamente alterada en respuesta a una condición patológica.

tes con bajo riesgo de EC. Por tanto, aunque es un método utilizado en los hospitales y presenta una gran utilidad todavía no es el método estándar para confirmar el diagnóstico. Otros biomarcadores que han sido previamente utilizados son los anticuerpos anti-gliadina, pero en la actualidad están completamente abandonados ya que presentan una baja sensibilidad y especificidad<sup>8</sup>, o los anticuerpos anti-endomisio ya que se unen también a la tTG y no aportan más información que los anticuerpos anti-tTG. Un nuevo biomarcador surgido en los últimos años han sido los anticuerpos frente a la forma deaminada de los péptidos de la gliadina (DGP)<sup>70</sup>, que podrían ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad si se combina con la detección de anticuerpos anti-tTG. Por otro lado, la presencia del antígeno leucocitario humano HLA-DQ2/DQ8 indica una predisposición genética a padecer la enfermedad, y puede ser de valiosa ayuda en el diagnóstico (cuando hay sospecha clínica y serología negativa). Sin embargo, su presencia no asegura que el paciente sufra la enfermedad (pero tiene un alto valor predictivo negativo).

La determinación de anticuerpos IgA anti-tTG se suele realizar en la práctica clínica rutinaria mediante un ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) comercial. Generalmente, la detección se ejecuta mediante un ensayo tipo sandwich según el esquema de la [Figura 1.21](#). La proteína transglutaminasa tisular se encuentra adsorbida a los pocillos de las placas ELISA, que tras la reacción con la muestra sérica se une al anticuerpo específico (en este caso anticuerpo IgA anti-tTG). A continuación, se realiza una nueva reacción con un anticuerpo marcado con una enzima (generalmente, HRP). Tras la reacción y la adición del sustrato y cofactor (generalmente, TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se genera una especie coloreada como producto de la reacción enzimática que es detectado por espectroscopía de absorción UV/Vis utilizando un lector de placas ELISA. Este proceso consume un tiempo considerable y diversas etapas de reacción hasta conseguir detectar el analito. Además, el lector de placas suele ser un equipamiento de laboratorio (de alto precio y tamaño), por lo que el análisis debe realizarse en un laboratorio y por personal altamente cualificado.

Diferentes metodologías para la detección de biomarcadores de la EC con dispositivos electroquímicos han sido desarrolladas en años recientes. Uno de los primeros inmunosensores electroquímicos para la detección de anticuerpos anti-tTG fue descrito por Balkehohl et al.<sup>71</sup>. Tras la inmovilización de tTG en la superficie de electrodos serigrafados de oro, un ensayo tipo sandwich fue llevado a cabo con la muestra y un anticuerpo marcado con HRP. La reacción enzimática resultante generaba un producto precipitado no

---

<sup>8</sup> En análisis clínicos, la sensibilidad indica la proporción de diagnosticar correctamente la enfermedad. La especificidad indica la proporción de diagnosticar correctamente un individuo sin la enfermedad.

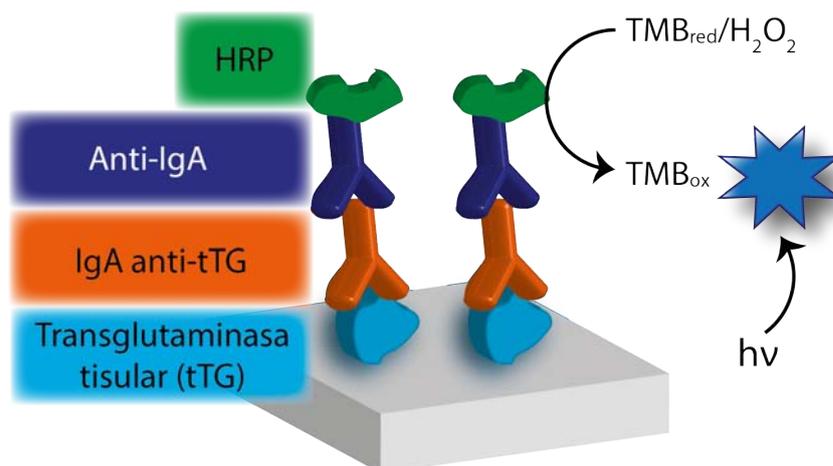


Figura 1.21: Esquema del típico ensayo ELISA utilizado para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG.

conductor, incrementando la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) de manera proporcional a la cantidad de analito en la muestra. El cambio en la  $R_{ct}$  fue medido mediante espectroscopia de impedancia electroquímica, aunque en este caso reactivos marcados son utilizados para mejorar las condiciones en comparación a la transducción impedimétrica sin marca. Otro ejemplo desarrollado por Pividori et al.<sup>72</sup> consistió en fabricar un sensor mediante la adsorción física de tTG en electrodos *composite* de grafito-epoxy (GEC). Este sistema sigue un ensayo tipo sandwich similar al anterior, pero usando hidroquinona como cofactor de la reacción enzimática con HRP y una detección amperométrica. Un sensor fabricado sobre electrodos de disco de oro como transductores fue descrito por Dulay et al.<sup>73</sup>, en el que se une la tTG de manera covalente a la superficie a través de monocapas autoensambladas. Un anticuerpo secundario marcado con HRP es también utilizado, pero TMB se utiliza como mediador para detectar amperométricamente la reacción enzimática. Una interesante ventaja mostrada de la inmovilización covalente es la mayor capacidad de la inmunoreacción y menores adsorciones no específicas, aunque la generación de la fase sensora es de mayor complejidad que mediante la adsorción física. Otros trabajos similares en los que se inmoviliza la tTG covalentemente sobre monocapas autoensambladas han sido descritos con detección amperométrica<sup>74</sup> o usando un dispositivo QCM<sup>75</sup> para detectar el cambio de masa producido por la reacción de reconocimiento. Un inmunoensayo magnético con detección electroquímica fue propuesto por Adornetto et al.<sup>76</sup>. Partículas magnéticas modificadas con tTG fueron utilizadas para un ensayo sandwich usando anticuerpos marcados con AP que genera un producto electroactivo. La detección

se lleva a cabo en SPEs con la ayuda de un imán que preconcentra las partículas magnéticas. Un sistema similar pero usando electrodos GEC para la detección y HRP como marca fue desarrollado por Kergaravat et al.<sup>77</sup>. La detección de una marca electroquimioluminiscente también ha sido utilizada en un biosensor para la determinación de anticuerpos anti-tTG<sup>78</sup>. Un inmunosensor desechable usando SPEs para la detección de anticuerpos anti-tTG fue desarrollado por Neves et al.<sup>7</sup>. Los SPEs fueron modificados con estructuras nanohíbridas que mejoran las características electrónicas<sup>79</sup> y se inmovilizó tTG sobre estos nanomateriales por adsorción física. La señal analítica fue la redisolución anódica de plata generada enzimáticamente usando AP como marca. Un sistema similar fue utilizado para la determinación de anticuerpos frente a los péptidos de gliadina deaminada, un nuevo biomarcador de la EC<sup>8</sup>. Y en un sistema de dos electrodos de trabajo se desarrolló un inmunosensor multianalito para la detección simultánea de anticuerpos frente a la tTG y la gliadina<sup>80</sup>. En relación a la detección de anticuerpos frente a la gliadina, otras estrategias electroquímicas para su detección han sido también descritas en la literatura<sup>80,81</sup>, pero por su baja importancia en el diagnóstico de la EC no son detallados en este texto.

Todos estos biosensores descritos para la detección de biomarcadores de la EC muestran unos resultados prometedores, pero sin embargo, los procedimientos complejos requeridos para llevar a cabo todo el proceso de reconocimiento biológico y detección, no permiten reemplazar los ensayos ELISA implantados en centros médicos. Aunque los ELISA tienen procedimientos también complejos, no es rentable su reemplazo por sistemas que, aunque con ciertas ventajas, no permiten una mejora general en los análisis o el diagnóstico de la enfermedad. Por tanto, los esfuerzos deberían enfocarse en buscar dispositivos que permitieran un análisis rápido de muy bajo coste, y que, minimizando la complejidad de los procedimientos analíticos, pudiera realizarse por personal no cualificado en centros distintos a los hospitales.

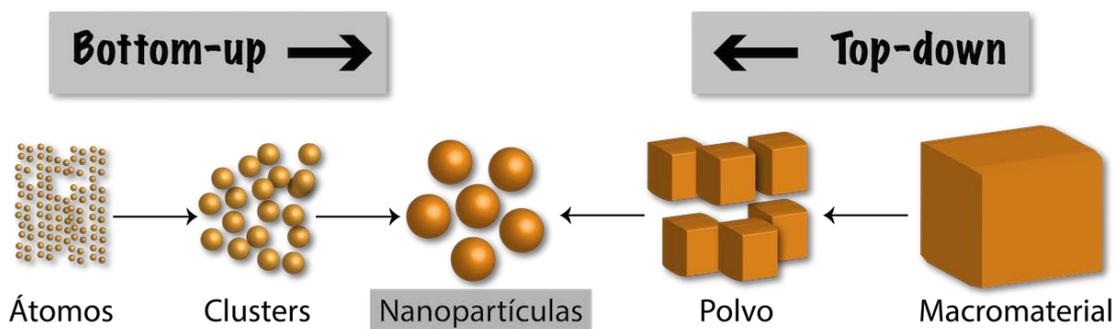


Figura 1.22: Esquema de las dos posibles estrategias de nanoestructuración: *bottom-up* y *top-down*.

### 1.3 NANOTECNOLOGÍA

En los últimos años ha cobrado un gran interés el diseño y empleo de materiales nanométricos, tanto desde un punto de vista científico como tecnológico, como vaticinó Richard Feynman en 1959 con su famosa frase: "There's plenty of room at the bottom". La **nanotecnología** es la ciencia que estudia los materiales nanoestructurados, materiales que presentan alguna de sus dimensiones en la escala nanométrica. La nanoescala normalmente se refiere a objetos en un rango entre 1-100 nm, rango que se encuentra justo por encima del tamaño molecular. Los nanomateriales poseen propiedades físicas y químicas únicas y diferentes a las que presenta el mismo material con dimensiones macroscópicas. Estas propiedades dependen de la ordenación de los átomos del material y del comportamiento electrónico en su estructura energética. En comparación a los materiales macroscópicos, la mayor relación superficie/volumen de los nanomateriales determina su mayor reactividad química y cambios en sus propiedades básicas. La relación superficie/volumen aumenta con la disminución del tamaño ya que un mayor porcentaje de los átomos totales estarán presentes en la superficie. Por tanto, en esta escala las leyes clásicas de la física dejan paso a un comportamiento explicado por la mecánica cuántica. Los métodos de nanofabricación pueden ser divididos en dos grandes grupos que se ilustran en la [Figura 1.22](#): *top-down* y *bottom-up*. En los métodos *top-down* se comienza desde materiales macroscópicos y alguna de sus dimensiones se reduce hasta la nanoescala, por ejemplo con técnicas litográficas o grabado químico. Los métodos *bottom-up* comienzan con átomos o moléculas que son ensamblados para construir nanoestructuras mediante reacciones químicas controladas como el autoensamblaje o métodos de deposición (de vapor o electrodeposición).

Los **nanomateriales de carbono** son unos de los más estudiados en la actualidad, especialmente los nanotubos de carbono (CNTs) y el grafeno, por las interesantes propiedades

que presentan en general, y especialmente, para aplicaciones eléctricas y electroquímicas. Los CNTs<sup>82</sup> son láminas de grafeno enrolladas con una forma de tubo cilíndrico, conformándose en dos situaciones, los CNTs de pared simple (SWCNTs) que poseen una sola lámina, y los CNTs de pared múltiple (MWCNTs) que están compuestos de varias láminas enrolladas de forma concéntrica. La longitud de los CNTs puede variar desde cientos de nm hasta  $\mu\text{m}$ , y los diámetros desde 0.2-2 nm para los SWCNTs y de 2-100 nm para los MWCNTs<sup>83</sup>. La síntesis de CNTs puede realizarse de varias formas entre las que destacan: ablación láser, descarga de arco eléctrico y deposición química de vapor. Para mejorar su solubilidad en medios acuosos, pueden ser funcionalizados con diferentes grupos funcionales oxigenados, nitrogenados y sulfurados. En general, los biosensores electroquímicos con CNTs pueden presentar varias propiedades: 1) una alta área superficial para la inmovilización de biomoléculas, 2) una excelente habilidad para acelerar la cinética de la transferencia electrónica de muchas reacciones electroquímicas, y 3) su pequeño tamaño permite la miniaturización del dispositivo sensor. El grafeno<sup>84</sup> es uno de los materiales con más proyección en la actualidad desde que Geim y Novoselov lo descubrieron con su famosa exfoliación utilizando cinta adhesiva<sup>85</sup>. Este material se compone de una red bidimensional de átomos de carbono enlazados por hibridación  $sp^2$ . Esta estructura le proporciona unas propiedades muy interesantes como un elevado área superficial (incluso mayor que los nanotubos), una excepcional conductividad eléctrica y térmica, alta resistencia mecánica y elasticidad. Estas características han resultado tener un gran impacto en electroquímica general<sup>86,87</sup>, y en sensores electroquímicos en particular<sup>88</sup>. Como el grafeno suele ser poco soluble en disolventes acuosos, el óxido de grafeno suele emplearse en mayor medida para aplicaciones electroanalíticas. Su reducción *in situ*<sup>89</sup> o electrodeposición<sup>90</sup>, permite recuperar las mejores propiedades grafénicas para este tipo de aplicaciones.

Las **nanopartículas metálicas** son clusters de unos pocos cientos o miles de átomos con un tamaño de pocos nanómetros. Debido a su pequeño tamaño, muchas de sus propiedades físicas y químicas son dominadas por las propiedades superficiales<sup>91</sup>. Se han descrito todo tipo de nanopartículas de diferentes materiales como metales (Au, Ag, Pt, Co), materiales semiconductores (CdS, CdTe, PbS) o de otro tipo como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{TiO}_2$ . Además, de su composición, nanopartículas con diferentes geometría han sido sintetizadas: esféricas, prismas, flores, tubos o barras, entre otras. Una propiedad muy interesante de muchas nanopartículas es su especial interacción con la luz. Por su pequeño tamaño, sus electrones no tienen la posibilidad de moverse libremente, y por ello, sus propiedades ópticas

dependen del tipo de movimiento que puedan hacer sus electrones. Estos movimientos electrónicos dependen del tamaño de la NP, por lo que la interacción con la luz es diferente en NPs de diferente tamaño, algo muy utilizado en sensores ópticos.

Desde un punto de vista de sus aplicaciones analíticas, se ha demostrado que los nanomateriales pueden ser utilizados para mejorar cualquiera de las etapas del proceso analítico, bien sea explotando sus especiales propiedades o su tamaño. Las nanopartículas metálicas y semiconductoras son ciertamente las más estudiadas y aplicadas con fines electroquímicos, siendo las aplicaciones más utilizadas como marca de detección de biosensores y como modificación de transductores para proporcionar una mejora de la transferencia electrónica, aumento del área electródica, propiedades catalíticas, o una inmovilización del elemento sensor más eficaz.

### 1.3.1 *Electrodos modificados con nanomateriales*

La nanotecnología ha proporcionado unas posibilidades muy importantes en diferentes aplicaciones, entre ellas en análisis electroquímico. Ya se ha comentado previamente la posibilidad de utilizar nanomateriales como marca de detección de biosensores electroquímicos. La otra gran aplicación en este campo es la mejora de las propiedades electródicas utilizando electrodos modificados con nanomateriales. Estos electrodos pueden funcionar como **transductores electroquímicos** si están acoplados a un elemento de reconocimiento, o pueden funcionar como **detectores electroquímicos** si se utilizan para la cuantificación de alguna especie sin formar parte de un sensor. En estos casos, la **electrocatalisis** que proporcionan ciertos nanomateriales suele ser muy importante para obtener un dispositivo analítico ciertamente selectivo. Algunas de las ventajas más importantes que poseen los electrodos nanoestructurados son las siguientes:

- un aumento del área superficial debido a la alta relación superficie/volumen de los nanomateriales. Este hecho ofrece diferentes resultados como la posibilidad de inmovilizar el transductor con una mayor carga proteica que mejore el rendimiento del sensor. Un mayor área superficial está, normalmente, relacionado con una mayor respuesta analítica y por tanto, con una mejora en la sensibilidad.
- la alta biocompatibilidad de muchos materiales nanoestructurados permiten una mejora en la fabricación de la fase sensora evitando la pérdida de funcionalidad que puede ocurrir al inmovilizar directamente las biomoléculas en un soporte sólido

macroscópico. El tamaño similar de los nanomateriales y las biomoléculas permiten un contacto más eficiente y una unión menos agresiva.

- las propiedades electrocatalíticas de algunos nanomateriales a diferentes reacciones electroquímicas que normalmente presentan una velocidad de transferencia electrónica lenta o no son activas en la ventana de potenciales del electrodo sin modificar. Es decir, disminuye el sobrepotencial necesario para producir una reacción electroquímica.
- ahorro de costes en comparación a usar un electrodo completamente del material. Este hecho es importante al utilizar materiales nobles como Au, Pt o Pd. Se ha demostrado que un *array* aleatorio de NPs en un sustrato conductor puede funcionar como un electrodo macroscópico del mismo material de las NPs, pero con un coste de fabricación significativamente menor.

#### *Modificación de electrodos con nanomateriales*

Los electrodos pueden ser modificados de diversas maneras con nanomateriales para generar un electrodo nanoestructurado. La forma de modificación y el material de partida utilizado es una etapa clave para obtener un detector electroquímico de alta calidad. Una de las cualidades de los electrodos serigrafiados es la facilidad con la que se puede modificar su superficie para conseguir mejoras en su comportamiento. Algunas de las formas más importantes de nanoestructuración de electrodos serigrafiados se describen a continuación:

- **Dopado de la tinta:** el nanomaterial se puede combinar con la tinta de serigrafiado, y el electrodo puede ser fabricado incorporando el nanomaterial dentro de su estructura. La ventaja de esta metodología es que los dispositivos fabricados ya poseen el material y no es necesaria una modificación posterior. Los mayores inconvenientes vienen dados por la necesidad del nanomaterial de soportar, sin perder sus características, tanto los disolventes de la tinta, como el proceso de fabricación y curado a alta temperatura.
- **Adsorción directa:** el nanomaterial es adsorbido de forma física (ya sea por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) o química (llamada quimisorción, proceso en el que se forman enlaces covalentes espontáneos) sobre la superficie del electrodo, por

simple colocación de una gota del nanomaterial dispersado en un disolvente adecuado y posterior secado para la evaporación del disolvente. El disolvente utilizado debe ser compatible con el material electródico.

- **Atrapamiento polimérico:** consiste en la adsorción sobre la superficie electródica del nanomaterial que se encuentra distribuido en una disolución con un polímero. Tras su deposición sobre el electrodo y la eventual evaporación del disolvente, el electrodo queda modificado con una red polimérica que contiene el nanomaterial.
- **Unión covalente:** la superficie electródica puede contener ciertos grupos funcionales (por ejemplo, materiales de carbono pueden contener grupos oxigenados) que pueden ser unidos a los nanomateriales de interés por sus grupos funcionales. Se suelen utilizar algunos compuestos intercalados entre el electrodo y el nanomaterial para controlar la unión de forma más eficaz.
- **Electrodeposición:** diferentes nanomateriales, especialmente nanopartículas metálicas, o polímeros conductores pueden ser electrodepositados sobre la superficie electródica mediante la aplicación de un potencial, barrido de potenciales o corriente eléctrica a una disolución que contenga un metal o complejo metálico oxidado o el monómero correspondiente, respectivamente. Por el interés de esta metodología y su estudio en el [Capítulo 7](#), el próximo apartado describirá la electrodeposición de nanopartículas metálicas.

Hay que destacar que estos tipos de modificaciones pueden ser combinados con diferentes materiales para formar estructuras nanohíbridas que se componen de dos o más nanomateriales sobre el electrodo de trabajo. La combinación de varios nanomateriales puede conferir mejoras en el rendimiento de estos electrodos en aplicaciones analíticas<sup>79,92</sup>.

#### *Electrodeposición de nanopartículas*

La electrodeposición es uno de los métodos más utilizados para generar superficies con nanopartículas metálicas sobre sustratos electródicos, y muy utilizada para diferentes aplicaciones analíticas o, incluso, industriales, como para mejorar la resistencia eléctrica o de corrosión de materiales. La electrodeposición de nanopartículas metálicas consiste en aplicar una magnitud de excitación capaz de producir la reducción de un catión metálico (o complejo metálico) hasta el estado de oxidación elemental (según la ecuación 1.6), de manera que el metal reducido (normalmente, cristalino) nuclea y crece sobre la superficie del

electrodo. La electrodeposición puede ser llevada a cabo mediante diferentes formas de excitación que pueden consistir en: aplicación de un potencial (o pulsos de potencial) (cronoamperometría), aplicación de una corriente catódica (cronopotenciometría), o mediante técnicas voltamperométricas. Las ventajas de la electrodeposición frente a otros métodos de modificación de superficies con nanopartículas son las siguientes:

- posibilidad de generar *in situ* las nanopartículas de manera sencilla, rápida y reproducible.
- mayor control de las nanopartículas generadas. Se ha demostrado que las condiciones experimentales utilizadas para la electrodeposición (como la magnitud de excitación, tiempo de electrodeposición, concentración de la especie precursora y el medio electrolítico) tienen un fuerte efecto en el tamaño, forma, densidad y características generales de las nanopartículas generadas, por lo que se pueden obtener superficies nanoestructuradas diferentes variando las condiciones experimentales<sup>93</sup>. Además, la geometría y tamaño de las NPs influye en la catálisis electroquímica<sup>94</sup>, y en consecuencia, una elección adecuada de las condiciones de electrodeposición pueden generar superficies con mayores propiedades catalíticas.
- es una técnica válida para diferentes tipos de sustratos conductores y de diferentes tamaños.



La electrodeposición metálica sobre electrodos de carbono, normalmente, sigue un mecanismo de Volmer-Weber<sup>95,96</sup>. Existen varias etapas en el crecimiento de una capa de átomos sobre la superficie electródica como se muestra en la [Figura 1.23](#) (para un mecanismo de nucleación progresiva). En primer lugar, se forman núcleos tridimensionales independientes de manera aleatoria en la superficie<sup>97</sup>. Existe un importante debate científico en explicar las zonas preferidas de nucleación dependiendo del tipo de material. Por ejemplo, varios autores describieron que los defectos estructurales (*step edges*) del HOPG eran zonas preferidas para la nucleación metálica, aunque se ha demostrado que la electrodeposición también ocurre en el plano basal y que los defectos de escalón no contribuyen significativamente al número de eventos de nucleación. Unwin et al. demostraron que las NPs generadas en estas zonas siguen un mecanismo de nucleación-crecimiento agregativo y desacoplamiento, ya que son fácilmente separadas de la superficie en contraste con las depositadas en zonas de defectos, más fuertemente unidas a la superficie<sup>98</sup>. En segundo

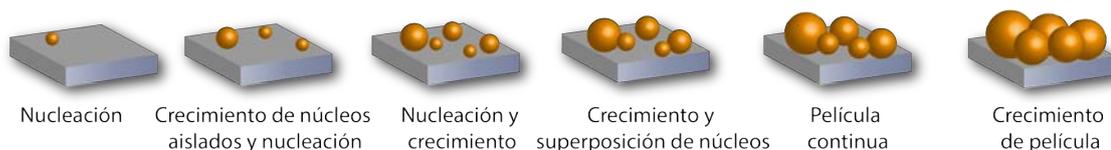


Figura 1.23: Esquema de la nucleación y crecimiento de nanopartículas por electrodeposición siguiendo el modelo de nucleación progresiva.

lugar, los núcleos aislados crecen con el tiempo según la difusión de la especie a la zona superficial del núcleo, aunque nuevas nucleaciones podrían ocurrir en diferentes sitios. Cada partícula aislada posee una capa de difusión individual y la difusión en estas condiciones viene determinada principalmente por una difusión radial. Con el paso del tiempo y el crecimiento de las nanopartículas, las capas de difusión aumentan y pueden superponerse en nanopartículas adyacentes. En ese caso, la difusión dejaría de ser radial y pasaría a ser prácticamente lineal, un tipo de difusión menos eficaz, por lo que el transporte de masa disminuiría, y esas nanopartículas crecerían menos que nanopartículas aisladas, cuyo crecimiento siguiera controlado por una difusión radial. Este es el principal motivo de la dispersión de tamaños en la electrodeposición de nanopartículas. Si existe un mayor recubrimiento metálico, el tiempo al que ocurre la superposición de las capas de difusión será menor<sup>99</sup>. La capa de difusión generada puede controlarse ligeramente según las condiciones utilizadas en la electrodeposición. Si se utiliza un sobrepotencial menor, las capas de difusión son menores, el crecimiento más lento, y por tanto, la posibilidad de acoplamiento entre capas de las nanopartículas vecinas es menor. Teóricamente en estas condiciones, la distribución de tamaños será más homogénea.

Este proceso de difusión en la electrodeposición es análogo al que va a afectar a una especie redox en un electrodo modificado con un *array* aleatorio de nanopartículas (Figura 1.24) si se considera inerte el sustrato conductor. A escalas de tiempo bajas (o velocidades de barrido altas), el consumo de material es confinado a la superficie y la difusión es esencialmente lineal al material electroactivo y en este caso, la respuesta refleja el área superficial de las nanopartículas no el área geométrica del electrodo. En una escala de tiempo mayor (velocidades de barrido más lentas), la difusión se convierte en convergente (radial) hacia la superficie de las nanopartículas y se establece un régimen de estado estacionario. A un tiempo algo mayor, el perfil de concentraciones de partículas individuales comienza a superponerse y dejan de tener difusión independiente. Con un recubrimiento alto de nanopartículas (distancia entre partículas baja) y velocidades de barrido muy bajas, la difusión principal es una difusión completamente lineal en toda la superficie del soporte

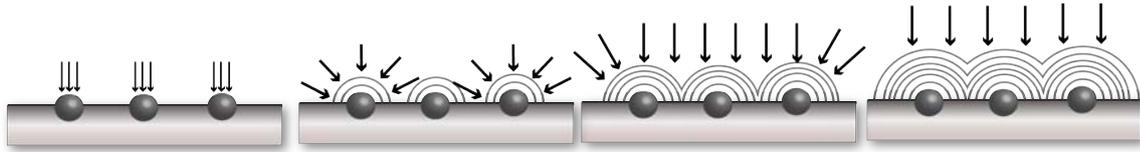


Figura 1.24: Perfiles de difusión generados alrededor de un conjunto aleatorio de nanopartículas en una superficie electródica.



Figura 1.25: Esquema de la nucleación y crecimiento de nanopartículas por electrodeposición siguiendo el modelo de nucleación instantánea.

electródico<sup>99,100</sup> y este electrodo se comporta como un electrodo fabricado completamente con el material de las nanopartículas, como ocurre en la mayoría de los experimentos típicos.

#### Modelo teórico de Scharifker-Hills para el estudio de la nucleación y crecimiento de partículas metálicas por electrodeposición

El modelo Scharifker-Hills es ampliamente utilizado para el estudio de nucleación y crecimiento de partículas metálicas generadas por electrodeposición. Para este modelo, hay dos mecanismos limitantes de la nucleación: instantánea y progresiva. La nucleación instantánea corresponde a un crecimiento lento de núcleos en un pequeño número de sitios activos (según el esquema de la Figura 1.25). La nucleación progresiva corresponde a un crecimiento rápido de núcleos en muchos sitios activos (según el mecanismo explicado anteriormente que se ilustra en la Figura 1.23). Típicamente, la nucleación progresiva conduce a una distribución de tamaños más heterogénea ya que al haber una mayor densidad de núcleos y una alta velocidad de crecimiento, es más probable que las capas de difusión se superpongan y el crecimiento sea diferente en unas zonas y otras de la superficie. Para evitar esta dispersión de tamaños como resultado de una formación progresiva de núcleos, se han realizado esfuerzos para separar, en tiempo, la formación de núcleos y su crecimiento. Esto se consigue típicamente al generar la nucleación con un pulso de potencial muy corto ( $< 10$  ms) a un sobrepotencial elevado con respecto al potencial de reducción del metal seguido de un pulso a un sobrepotencial bajo durante más tiempo dónde no se generan nuevos núcleos<sup>101</sup>.

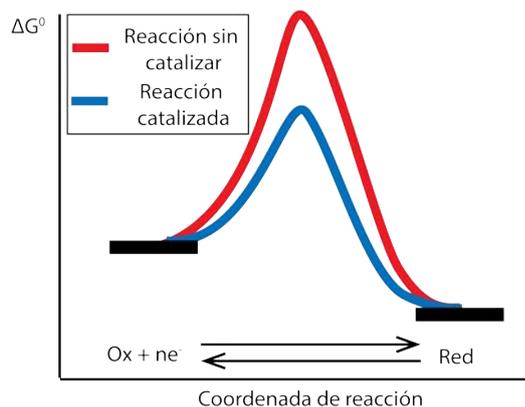


Figura 1.26: Perfil de energías para una reacción de un solo paso sin catalizar y catalizada.

### Electrocatalisis

La catálisis mediada por nanomateriales es un campo creciente que involucra el uso de nanopartículas como catalizadores de una variedad de reacciones orgánicas o inorgánicas. Un catalizador es un material que incrementa la velocidad de una reacción química (cinética), disminuyendo su energía de activación, sin ser consumido en el proceso y sin modificar el cambio de energía libre de Gibbs. Numerosas revisiones han sido publicadas en los últimos años sobre catálisis heterogénea donde las nanopartículas se encuentran en un soporte sólido o en disolución coloidal. El comportamiento catalítico de las nanopartículas puede ser ajustado por su composición, forma y tamaño. Un catalizador funciona proporcionando un mecanismo alternativo con un diferente estado de transición de menor energía (ver perfil de energías en la [Figura 1.26](#)). Por esa razón, más colisiones moleculares tendrán la energía suficiente para alcanzar este estado de transición. Sin embargo, el catalizador no cambia el equilibrio químico (termodinámica) de una reacción ya que las energías de las especies inicial y final son las mismas.

La electrocatalisis estudia la catálisis de las reacciones electroquímicas (donde la transferencia electrónica se produce en la interfase electrodo/disolución). Un electrocatalizador puede funcionar en modo heterogéneo como superficies de platino o nanopartículas, o homogéneo como complejos de coordinación o enzimas. El electrocatalizador asiste en la transferencia electrónica entre el electrodo y el reactivo, y/o facilita la transformación química de una de las semi-reacciones que ocurren en la celda electroquímica. Bastantes reacciones electroquímicas requieren de un sobrepotencial elevado<sup>9</sup> para llevarse a cabo a

<sup>9</sup> El sobrepotencial es la diferencia entre el potencial aplicado al electrodo y el potencial de equilibrio definido por la ecuación de Nernst (que se describe en apartados posteriores).

## Electrocatalisis heterogénea

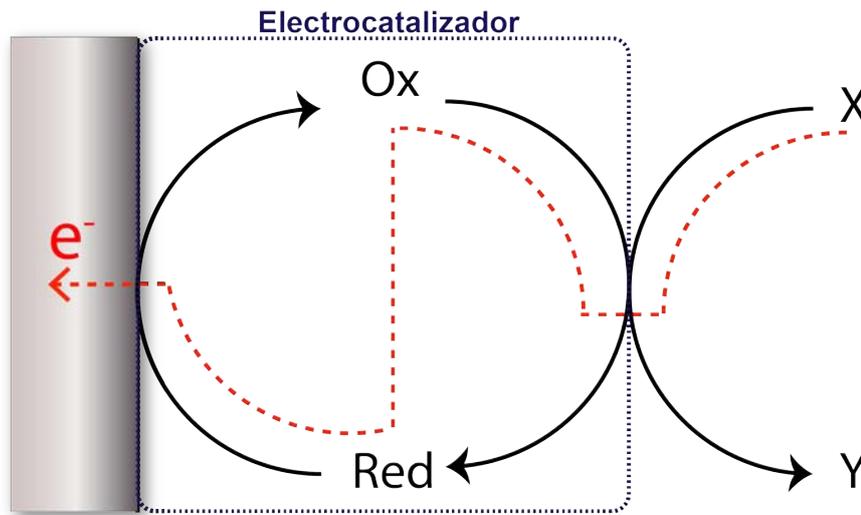


Figura 1.27: Esquema simplificado de la electrocatalisis heterogénea en la superficie electródica.

una velocidad apreciable (reacciones quasi-reversibles o irreversibles). Este hecho es especialmente relevante cuando la reacción no sigue un mecanismo de transferencia electrónica de esfera externa, sino que se produce de forma más compleja con rotura y formación de enlaces (mecanismo de esfera interna). Con la ayuda de un electrocatalizador, el aumento de la velocidad de reacción y la disminución del sobrepotencial necesario puede permitir producir la reacción a un potencial cercano al potencial de equilibrio (reacciones reversibles). La electrocatalisis heterogénea implica una interacción específica entre el reactivo (o intermedio de reacción) y el material electródico o un recubrimiento sobre la superficie electródica. El mecanismo de la electrocatalisis heterogénea se muestra en la [Figura 1.27](#).

La electrocatalisis heterogénea conlleva un proceso superficial ya que la transferencia electrónica es un proceso eminentemente superficial, y en consecuencia, un área superficial elevada puede promover una catálisis eficiente. Como se explicó anteriormente, las nanopartículas presentan un gran área superficial por su elevada relación superficie/volumen, y por tanto, se convierten en herramientas excelentes para producir reacciones catalizadas. Como un ejemplo, nanopartículas de  $\text{Mo}_2\text{C}$ , utilizadas para catalizar la reacción de evolución de hidrógeno presentan un área superficial de  $120 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Esto es una espectacular relación entre el área geométrica del material y la superficie real que presenta. Este es el verdadero poder de la nanotecnología. Por otro lado, se ha descrito que la respuesta de un electrodo nanoestructurado depende de factores como el recubrimiento

superficial, la geometría de las nanopartículas, el potencial aplicado y la actividad catalítica inherente del nanomaterial<sup>102</sup>. Por eso, variaciones en estas propiedades puede variar el efecto catalítico de un electrodo nanoestructurado frente a la misma reacción electroquímica.

Las reacciones más estudiadas que hacen uso de electrocatalizadores nanoestructurados son las reacciones redox del oxígeno y del hidrógeno, por su importancia en el campo de la energía y desarrollo de fuel cells. A continuación, se introduce brevemente la reacción de reducción de protones o evolución de hidrógeno (HER) y la reacción de reducción de oxígeno (ORR), ya que aparecen mencionadas en algún momento durante esta Tesis Doctoral. La HER es la reacción que se encarga de producir el combustible (hidrógeno) en las pilas de combustible (*fuel cells*). De manera simplificada, esta reacción suele seguir el mecanismo conocido como Tafel-Volmer (adsorción, transferencia de carga y desorción) esquematizado en las siguientes ecuaciones:



dónde \* indica un sitio activo del catalizador. Esta reacción, aunque está catalizada en superficies metálicas, y su potencial depende del pH del medio (mayor concentración de  $H^+$ , potencial más positivo), cuando se aplica un potencial lo suficientemente negativo en una disolución acuosa siempre suele ocurrir. La ORR es la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  que conlleva la transferencia de cuatro electrones. El mecanismo de esta reacción es relativamente complejo con varias etapas/intermedios, pero en la actualidad, se cree que el mecanismo predominante involucra un intermedio adsorbido de  $H_2O_2$  en primera instancia (transferencia de  $2 e^-$ ), antes de sufrir la reducción completa. Además, esta reacción muestra dependencia con el pH del medio, y típicamente aparece a un potencial más positivo en medios alcalinos (y también suele ser catalizada por metales o nanopartículas metálicas<sup>101</sup>). Si se trabaja en condiciones normales, sin desairear las disoluciones, esta reacción puede observarse con algunas técnicas voltamperométricas<sup>103</sup>.

Existen algunas aplicaciones muy interesantes que hacen uso de detectores nanoestructurados y procesos electrocatalíticos como la determinación no enzimática de glucosa. La determinación de glucosa ha sido la aplicación más destacada de los biosensores electroquímicos por la popularidad alcanzada por las tiras reactivas para la monitorización de glucosa en sangre en pacientes con diabetes<sup>104</sup>. La estabilidad conseguida por estos

sensores (algunos meses), el bajo coste, la miniaturización del instrumento de medida y la fuerte necesidad por los pacientes a llevar un control de la glucosa en sangre son las razones por las cuales el sensor de glucosa mueve un mercado anual tan importante. Además, la determinación de glucosa tiene también importancia en diferentes campos como el agroalimentario.

Diferentes estrategias han sido utilizadas para resolver este problema a lo largo de los años, pero, básicamente, el sensor de glucosa se ha basado en un sensor enzimático utilizando glucosa oxidasa (GOx). Esta enzima presenta una alta especificidad y estabilidad, además de una fácil disponibilidad. Sin embargo, un mediador electroquímico que sea capaz de llevar electrones desde la enzima hasta la superficie electródica es necesario en el sistema para poder realizar las medidas con un menor sobrepotencial. Con el objetivo de eliminar la necesidad del mediador simplificando el sistema, otras alternativas han sido realizadas como por ejemplo, la detección directa del  $H_2O_2$  generado en la reacción enzimática de la GOx. Un esquema de este sistema se muestra en la [Figura 1.28](#). Generalmente, se necesita la aplicación de un sobrepotencial elevado para llevar a cabo la oxidación o reducción del  $H_2O_2$  en muchos materiales electródicos, algo que influye en la selectividad de la medida. Por esta razón, diferentes tipos de electrodos han sido modificados con nanomateriales que pueden electrocatalizar las reacciones redox del  $H_2O_2$ , aumentando su velocidad de transferencia electrónica y disminuyendo el sobrepotencial necesario. Uno de los materiales que electrocatalizan la reducción del  $H_2O_2$  es la plata. La electro-reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , en presencia de Ag<sup>105,106</sup>, puede comenzar predominantemente con un paso de disociación química y posterior reducción:



Por otro lado, en los últimos años se ha estado buscando constantemente una alternativa evitando la utilización de enzimas en el sistema de detección. Según Wilson and Turner<sup>107</sup>, la GOx pierde su actividad a un pH por debajo de 2 y por encima de 8, a una temperatura por encima de 40 °C, y en presencia de surfactantes. Estos problemas no permiten la utilización de sensores de glucosa en ciertas aplicaciones que necesitan de condiciones más extremas (por ejemplo, en procesos de fermentación). Una de estas alternativas es utilizar las propiedades electrocatalíticas de ciertos nanomateriales para la detección directa de

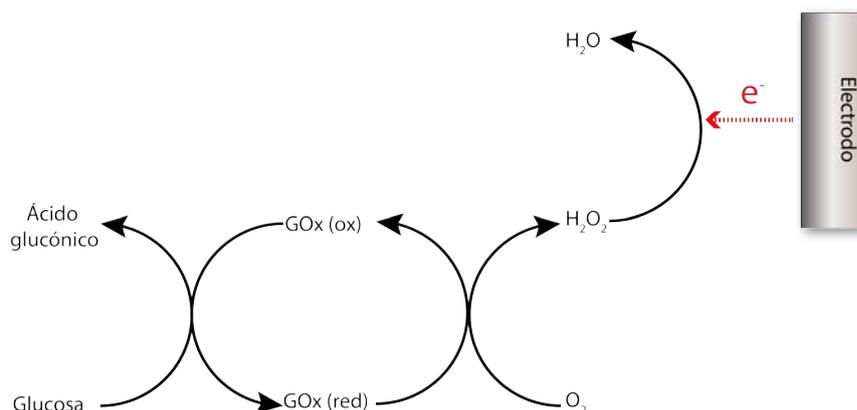


Figura 1.28: Mecanismo de reacción enzimática de la glucosa con GOx y detección electroquímica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado.

glucosa con un detector electroquímico nanoestructurado. Con estos sistemas se conseguiría un ahorro de costes por la simplicidad en la fabricación o una mayor estabilidad. En la detección no enzimática de glucosa existen dos aspectos claves que tienen que ser resueltos adecuadamente: la mejora de la sensibilidad, y evitar posibles interferencias de otras especies electroactivas. La electrocatálisis con nanomateriales puede ayudar a resolver estos problemas ya que la detección se produce a un menor sobrepotencial que ayuda a mejorar la selectividad, mientras que la elevada área superficial suele producir una mejora en la señal analítica, y por consiguiente, en la sensibilidad. Históricamente se han utilizado nanomateriales de metales nobles para la detección no enzimática de glucosa como Pt, Au o Pd. Sin embargo, por su alto precio, la última tendencia es la utilización de nanomateriales de menor coste como los basados en Ni y Cu. El funcionamiento de estos detectores es el siguiente: en un medio alcalino su superficie suele estar pasivada de forma espontánea (formando óxidos o hidróxidos en estado de oxidación M(II)). Tras la aplicación de un potencial se puede producir la oxidación a una especie con estado de oxidación M(III), muy reactiva, que es capaz de oxidar la glucosa en disolución (y, en consecuencia regenerar la especie inicial M(II)). Esta reacción química acoplada desplazará el equilibrio de la primera reacción electroquímica (M(II) a M(III)) según el principio de Le Chatelier, cuya corriente generada será proporcional a la concentración de glucosa en disolución. En términos generales, se produce una reacción electrocatalítica que depende de la concentración de glucosa en disolución. Un esquema de este mecanismo se muestra en la [Figura 1.29](#).

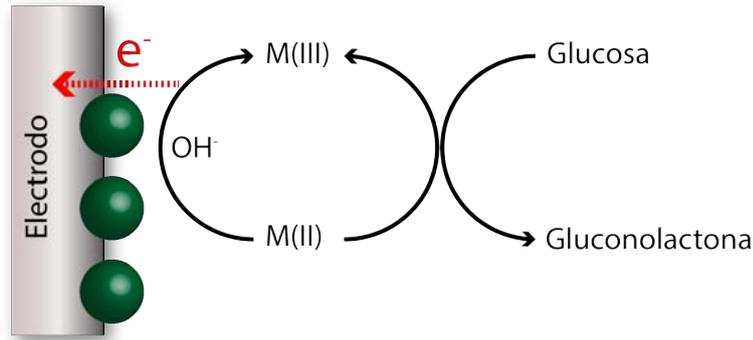


Figura 1.29: Mecanismo de la oxidación de glucosa electrocatalizada por nanopartículas metálicas de níquel o cobre.

Los electrodos de cobre y derivados han sido empleados con esta estrategia para la detección de glucosa. Una preocupación utilizando este tipo de electrodos es la selectividad solamente hacia la glucosa y no a otros azúcares oxidables. Sin embargo, en la mayoría de los casos parece ser que la glucosa se comporta de manera diferente a otros azúcares y, en general, no se han encontrado interferencias con otros azúcares utilizando este tipo de electrodos. Por tanto, la mayor desventaja de estos sistemas parece encontrarse en la necesidad de emplear un pH alto de la disolución ya que la electrocatálisis depende de los iones  $OH^-$  que haya disponibles, y estos sensores a un pH fisiológico no suelen mostrar un comportamiento tan eficaz.

### 1.3.2 Quantum dots

Los quantum dots (QDs) son nanopartículas cristalinas de materiales semiconductores descubiertas en 1981<sup>108</sup> con propiedades ópticas, químicas y electrónicas únicas, cuya primera aplicación más significativa fue desarrollada y publicada en 1998 en la revista Science por los grupos de Alivisatos y Nie, que consistía en la visualización de tejidos vivos gracias a las características fluorescentes de estos nanocristales<sup>109,110</sup>. Los QDs están compuestos de cientos o miles de átomos de una mezcla de elementos de los grupos de la tabla periódica II-VI (CdSe, CdTe), III-V (GaN, InAs) o IV-VI (PbSe, PbS)<sup>111,112</sup>. En general, presentan una geometría quasi-esférica con un tamaño típicamente entre 1-10 nm que proporciona propiedades optoelectrónicas únicas debido al efecto del confinamiento cuántico. Este efecto se basa en que los electrones y huecos de los QDs están confinados en las tres dimensiones del espacio cuando el tamaño de la nanopartícula es menor al radio

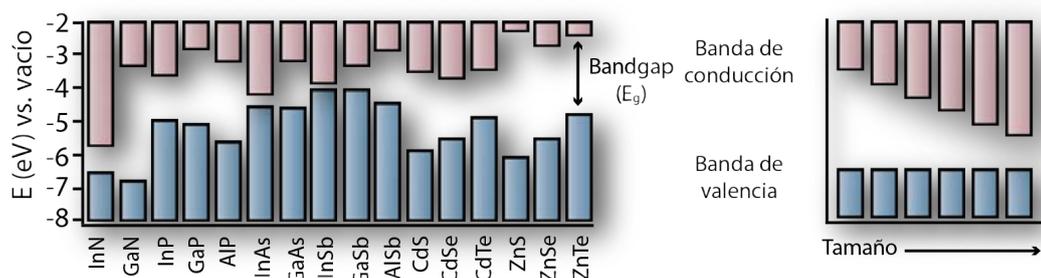


Figura 1.30: Energía de las bandas de QDs de diferentes materiales y del mismo material de diferente tamaño.

del excitón de Bohr<sup>113,10</sup>. Por tanto, los estados electrónicos (diferencia entre el HOMO y LUMO) y los perfiles de emisión luminiscente, varían con el tamaño del QD, siguiendo de manera general, el comportamiento esperado para una partícula atrapada en una caja 3D. De hecho, los niveles energéticos de los QDs se comportan de forma más parecida a átomos o moléculas (niveles discretos cuantizados) que a un material macroscópico y en ocasiones son llamados *átomos artificiales*. Además, los QDs de diferentes materiales o del mismo material con diferentes tamaños, debido al confinamiento, presentan un *bandgap*<sup>11</sup> con diferente energía, como se esquematiza en la [Figura 1.30](#). Este hecho permite generar fotoluminiscencia con bandas estrechas de emisión y ajustable según el tamaño y material de las nanopartículas<sup>114,115</sup>.

La fotoluminiscencia puede ocurrir mediante la absorción de fotones de energía superior al *bandgap*, que crea un excitón (par electrón-hueco) y su posterior relajación vía fonones (movimiento vibracional) al estado excitado de menor energía, la emisión se produce desde el nivel más bajo del estado excitado hasta el estado fundamental. Si el tiempo de vida del estado excitado es mayor, incluso después de eliminar la fuente de excitación, la emisión es fosforescente, mientras que con un tiempo de vida menor del estado excitado, la emisión es fluorescente. El efecto del confinamiento cuántico ofrece a los QDs algunas propiedades ópticas como un amplio espectro de excitación, un espectro de emisión estrecho y ajustable (dependiendo del material y tamaño del QD), alta fotoestabilidad (mantienen la fluorescencia durante horas) y un tiempo de vida del estado excitado alto (30-200 ns), que les ofrecen numerosas ventajas frente a los fluoróforos moleculares más utilizados. De hecho, la intensidad de fluorescencia de un QD de CdSe es aproximadamen-

<sup>10</sup> De manera simplificada, el radio del excitón de Bohr, es la distancia media entre el electrón y el hueco generados en una excitación electrónica.

<sup>11</sup> El *bandgap* es la diferencia de energía entre la banda de valencia (llena de electrones) y la banda de conducción (vacía).

te 20 veces superior a una molécula de Rhodamina y 100-10000 veces superior a colorantes orgánicos estándar<sup>116</sup>.

Un proceso interesante que muestra la complejidad de estos materiales es que su emisión suele ser discontinua bajo excitación (se enciende y apaga intermitentemente)<sup>117,118</sup>. La transición de un estado encendido a uno apagado ocurre por fotoionización, que implica el atrapamiento de un portador de carga (ya sea un hueco o un electrón) en algún defecto superficial, mientras que su portador opuesto se crea en el núcleo de la NP. Esto conduce a una relajación no radiativa rápida a través de procesos Auger (transferencia de energía del excitón creado al portador de carga deslocalizado)<sup>119</sup>. El mecanismo para volver al estado encendido implica la captura del portador de carga localizado en el núcleo o la captura del portador de carga opuesto desde la zona de atrapamiento en la proximidad. Ambos mecanismos pueden ser acompañados por una reorganización de la distribución de la carga<sup>120,121</sup>. Debido a este proceso, el rendimiento cuántico de los QDs no llega a alcanzar el 100% (ya que en todo momento algunas NPs se encuentran en estado apagado).

Una de las razones por las que el núcleo se recubre con un recubrimiento de otro semiconductor (NPs *core-shell*), pasivando la superficie, es para mitigar estos procesos, disminuyendo los defectos estructurales que son capaces de producirlo (aunque no se consigue eliminar del todo). Este tipo de estructura *core-shell* también tiene un efecto positivo en la estabilidad general del núcleo de la nanopartícula e incrementa la fotoestabilidad<sup>122</sup>. Existen tres tipos principales de QDs *core-shell*, el Tipo I cuando el *bandgap* del recubrimiento es mayor que el *bandgap* del núcleo, por lo que el excitón generado se confina en el núcleo (por ejemplo, CdSe/ZnS), el Tipo I-inverso, cuando el *bandgap* del recubrimiento es menor que el *bandgap* del núcleo, por lo que el excitón se deslocaliza en el recubrimiento y la emisión puede ser ajustada cambiando el tamaño del recubrimiento (por ejemplo, ZnSe/CdSe), y el Tipo II, cuando el extremo de la banda de valencia o de conducción del recubrimiento tiene una energía dentro del *bandgap* del núcleo. Este alineamiento conduce tras la excitación de la NP a una separación espacial entre el hueco y el electrón en diferentes regiones de la estructura.

Por sus interesantes propiedades optoelectrónicas, los QDs han sido utilizados en numerosas aplicaciones<sup>123</sup> como en nanoelectrónica, celdas solares, fotocatalisis, marcado celular, bioensayos fluorescentes e imaging biológico.

### 1.3.2.1 Síntesis

Las diferentes estrategias y condiciones experimentales de la síntesis de QDs son muy relevantes ya que pueden alterar sus propiedades, y por tanto, afectar a sus aplicaciones<sup>111</sup>. Las técnicas *top-down* han sido empleadas para la fabricación de QDs pero las técnicas *bottom-up* de síntesis son las principales desde su introducción por Bawendi et al.<sup>124</sup>. Aunque la síntesis depende en gran medida del material objetivo, se consideran dos métodos principales: síntesis organometálica<sup>125</sup> y síntesis en medio acuoso<sup>126</sup>. La estrategia general en ambos métodos consiste en la nucleación de un conjunto (*clúster*) de átomos inorgánicos que eventualmente, se expande hasta un núcleo cristalino. En ocasiones, un recubrimiento de otro semiconductor (*shell*) se hace crecer sobre el núcleo inicial. Esto se realiza en un medio con ligandos surfactantes (por ejemplo, óxido de trioctilfosfina o ácido mercaptopropiónico) que recubren la superficie de la nanopartícula generada aumentando su estabilidad y solubilidad. En el caso de la síntesis organometálica, un paso posterior con otro tipo de recubrimiento es necesario para solubilizar la nanopartícula en un medio acuoso.

La técnica de inyección en caliente es la más utilizada para la síntesis organometálica, en la que diferentes precursores, disolventes o ligandos pueden ser utilizados, y con la que se obtienen QDs de alta calidad. Muy brevemente, esta técnica comienza tras la adición de precursores organometálicos de los metales de interés en un disolvente orgánico, y el crecimiento de los nanocristales se realiza a una temperatura entre 200-300 °C. En el caso de los QDs de Cd, que son los más estudiados, los precursores suelen ser dimetilcadmio, óxido de cadmio o acetato de cadmio, especialmente los dos últimos por la mayor toxicidad del primero. El disolvente orgánico normalmente utilizado es trioctilfosfina (TOP) o su óxido (TOPO) que también funciona como ligando estabilizador de la NP generada. Las condiciones de temperatura y tiempo de reacción pueden influir en el tamaño de las nanopartículas. Tras una etapa de purificación del producto (precipitación y redispersión), se puede llevar a cabo el recubrimiento con otro semiconductor (en un proceso similar) para generar QDs *core-shell*. Como muchas de las aplicaciones en las que se utilizan requieren de su solubilización en un medio acuoso, se suele añadir un ligando bifuncional que pueda unirse a los QDs por un extremo (ya sea directamente a la nanopartícula o a los ligandos orgánicos) y que por el otro extremo posea un grupo polar soluble en agua.

En general, la síntesis acuosa suele ser más simple y llevada a cabo en condiciones más suaves, pero es más difícil el control de las propiedades de las nanopartículas generadas.

Brevemente, consiste en la reacción entre un ion metálico (o un complejo metálico) y un precursor que contenga la especie calcógena en presencia de un ligando que estabilice las nanopartículas tras su crecimiento evitando la aglomeración. Los ligandos que recubren la nanopartícula pueden utilizarse para su posterior funcionalización biológica.

En este sentido, para aplicaciones biológicas o bioanalíticas, los QDs deben estar funcionalizados con biomoléculas como péptidos, oligonucleótidos o proteínas. Varios métodos de modificación han sido desarrollados en los últimos años, aunque el método más común para preparar QDs biofuncionalizados es mediante la formación de enlaces covalentes entre grupos carboxílicos (presentes en los ligandos superficiales) y grupos amino de las biomoléculas. Además, biomoléculas que posean grupos funcionales como aminas o tioles pueden interactuar directamente con la superficie de QDs como ligandos. El producto resultante combina las propiedades de los QDs y la función de las biomoléculas enlazadas.

#### 1.3.2.2 *Características y aplicaciones electroquímicas*

Los QDs presentan características electroquímicas muy interesantes. Por un lado, se puede utilizar las técnicas voltamperométricas para estudiar la transferencia electrónica desde y hacia los QDs, para obtener información sobre las propiedades estructurales y energéticas de estos nanocristales. Por otro lado, los QDs también presentan una interacción interesante entre la radiación electromagnética y la transferencia electrónica que se traduce en su electroquimioluminiscencia (ECL) y propiedades fotoelectroquímicas (PEC). Por último, la detección electroquímica de los metales que componen los QDs es una estrategia muy utilizada en bioensayos para la detección de biomoléculas de interés.

#### *Comportamiento electroquímico de quantum dots*

El comportamiento electroquímico de los QDs ha sido extensamente investigado<sup>127</sup>, aunque en menor medida que sus propiedades ópticas. Las medidas voltamperométricas pueden ser utilizadas para evaluar los niveles energéticos disponibles en las nanopartículas (banda de valencia y banda de conducción), información de interés para entender sus procesos de transferencia electrónica. Esta información electroquímica también puede ayudar a la interpretación de las propiedades espectroscópicas de los QDs, y obtener información sobre su composición química, dimensiones, y propiedades superficiales.

Cuatro tipos de procesos de transferencia electrónica pueden ocurrir en los QDs<sup>128</sup>, ilustrados en la [Figura 1.31](#) y descritos a continuación:

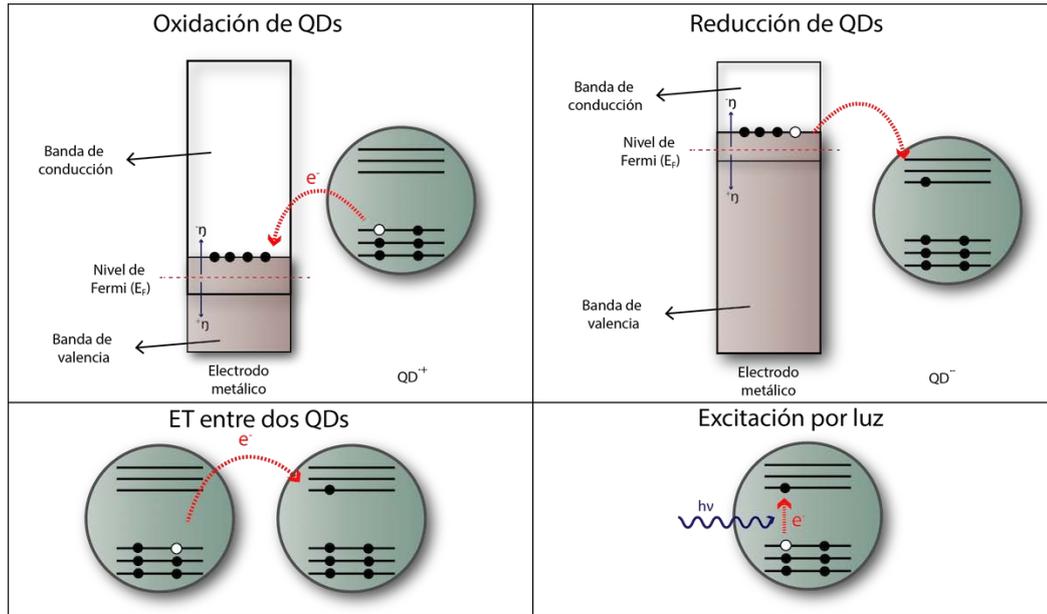


Figura 1.31: Esquema del mecanismo de las posibles transferencias electrónicas que involucran los QDs.

1. inyección de electrones en una partícula neutra, produciendo su reducción ( $QD^-$ ).
2. extracción de electrones de una partícula neutra (o inyección de huecos), produciendo su oxidación ( $QD^+$ ).
3. inyección simultánea de un electrón y un hueco en dos QDs independientes, que corresponde al *bandgap* electroquímico (también llamado *quasi-particle gap*). Se corresponde con la diferencia de energía entre el primer proceso de reducción y el primer proceso de oxidación de los QDs.
4. generación de un par electrón-hueco en la misma partícula, causado por una excitación óptica, que da información sobre el *bandgap* óptico.

El *bandgap* óptico y electroquímico pueden relacionarse según la 1.11, donde  $\Delta E_{op}$  es el *bandgap* óptico,  $\Delta E_{el}$  es el *bandgap* electroquímico, y  $J_{e,h}$  es la energía total de interacción coulombiana del par electrón-hueco. Típicamente, el *bandgap* electroquímico es mayor que el óptico.

$$\Delta E_{op} = \Delta E_{el} - J_{e,h} \quad (1.11)$$

Brus predijo una dependencia del potencial redox con el tamaño de los QDs usando el modelo de partícula en una caja<sup>115</sup>. Bard et al. demostraron una correlación directa entre el *bandgap* electroquímico y el espectro electrónico de CdS<sup>129</sup>, en la que encontraron una diferencia de potenciales entre el primer proceso anódico (transferencia en el HOMO) y el primer proceso catódico (transferencia en el LUMO) de 2.96 V, comparable al valor calculado por medidas ópticas de 3.23 eV. Las corrientes obtenidas en la transferencia fueron 2 órdenes de magnitud mayores que las esperadas para una transferencia electrónica de 1 e<sup>-</sup> en una especie controlada por difusión, por lo que propusieron que cerca de 50 electrones por partícula eran transferidos a un potencial cercano al potencial de pico. Este proceso sigue un mecanismo (EC)<sub>n</sub> donde los electrones son consumidos en una reacción acoplada. También propusieron que los electrones y huecos generados eran atrapados en la superficie de la nanopartícula. Por lo tanto, Bard concluyó que los QDs pueden actuar como donantes o aceptores multielectrónicos debido al atrapamiento de huecos y electrones en la superficie de la partícula. Resultados similares fueron encontrados en QDs de PbS y CdTe<sup>130</sup>. Otros autores encontraron diferencias en el *bandgap* obtenido por técnicas electroquímicas o espectroscópicas para QDs de pequeño tamaño o de tamaño elevado<sup>131</sup>. Este hecho puede deberse a que los QDs de tamaños extremos presentan una mayor densidad de defectos superficiales, y las técnicas electroquímicas ofrecen una mayor información sobre la superficie, en comparación a técnicas ópticas que proporcionan información sobre el interior de la nanopartícula<sup>132</sup>. Por tanto, la electroquímica puede utilizarse para obtener información sobre la calidad de la estructura cristalina (defectos superficiales)<sup>127,133</sup>. Por ejemplo, medidas voltamperométricas fueron utilizadas para investigar CdSe recubiertos con ZnS<sup>134</sup>. La presencia del recubrimiento, que permite minimizar los defectos superficiales, causa un desplazamiento de los potenciales de pico.

Normalmente, las medidas electroquímicas de QDs para obtener información estructural deben ser hechas en un medio orgánico<sup>129</sup> o en líquidos iónicos<sup>133</sup>, donde estas nanopartículas son más estables, y además, es posible el estudio de una mayor ventana de potenciales en comparación a disoluciones acuosas<sup>135</sup> (aunque también se han propuesto medidas en medio acuoso). Las medidas electroquímicas de QDs presentan dos inconvenientes principales, la baja solubilidad (alrededor de  $\mu\text{M}$ )<sup>129</sup> y los bajos coeficientes de difusión de estas nanopartículas (del orden de  $10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ), resultando en bajas corrientes voltamperométricas. Además, la irreversibilidad de la transferencia electrónica puede causar la descomposición de las partículas. Las técnicas electroquímicas también han sido empleadas para estudiar la estabilidad (*aging*) y diferentes formas de almacenamiento

de diferentes QDs (PbS, CuS, CdS, CdTe)<sup>136</sup>. En otro sentido, los QDs pueden ser utilizados para la transferencia electrónica directa desde un electrodo al centro redox de una proteína, ayudada por una especie redox en disolución .

#### *Propiedades foto-electroquímicas de los quantum dots*

Los QDs también pueden ser utilizados en experimentos de espectroelectroquímica por sus propiedades de absorción y luminiscencia, que en algunos casos pueden tener cierta dependencia con la excitación electroquímica<sup>137,138</sup>. Por ejemplo, este tipo de experimentos se han utilizado para estudiar con más detalle el proceso de blinking de los QDs individuales, antes mencionado<sup>139,140</sup>. Los QDs presentan también propiedades de electroquimioluminiscencia (ECL). La ECL consiste, de manera simplificada, en causar la excitación de una especie mediante la aplicación de un potencial eléctrico (por una transferencia electrónica), y cuando la especie vuelve al estado fundamental, emite luz. Esta luz puede ser detectada por medio de un espectrómetro de fluorescencia (a la longitud de onda deseada), pero también de manera global por un fotomultiplicador o un dispositivo de carga acoplada (CCD). A principios de este siglo, el grupo de Bard encontró que los QDs poseían propiedades ECL<sup>141,142</sup>. La ECL, ya que la excitación se realiza mediante una transferencia electrónica, es un proceso que depende fuertemente de los estados energéticos de la superficie de los QDs, que, en general, tienen una menor energía que los estados energéticos del núcleo. Por tanto, según el potencial aplicado, puede producirse una transferencia electrónica, en primer lugar, hacia los estados superficiales (cuya emisión está desplazada hacia el rojo en comparación con la PL), obteniendo información sobre la calidad superficial de la nanopartícula. A mayores potenciales, la transferencia puede producirse a los niveles de mayor energía del núcleo, que son similares a los que intervienen con una excitación mediante fotones, y por tanto, su relajación emite luz a una longitud de onda similar a la PL. El primer tipo de ECL puede intensificarse si se aumenta la densidad de defectos superficiales, por una activación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o ácido cítrico<sup>143</sup>, mientras que el segundo tipo puede intensificarse disminuyendo los defectos superficiales utilizando un recubrimiento en una estructura core-shell<sup>144</sup>. Existen dos mecanismos principales para generar QDs en estado excitado mediante ECL<sup>145</sup>:

- el mecanismo de aniquilación, en el que un barrido de potenciales en ambas direcciones (catódica y anódica) puede generar cationes y aniones radical (QD<sup>+</sup> y QD<sup>-</sup>), que tras su colisión posterior forma un QD en estado fundamental y un QD\* en es-

tado excitado que es capaz de emitir luz tras su relajación. Estos radicales deben ser estables el suficiente tiempo para su colisión, y se requiere de altos sobrepotenciales.

- el mecanismo del correactante, en el que con un barrido en una sola dirección, se genera una de las especies ion radical (ya sea  $QD^+$  o  $QD^-$ ), que reacciona con el intermedio oxidante o reductor de un correactante en disolución para generar la especie excitada  $QD^*$ . Algunos de los correactantes utilizados son:  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $S_2O_8^{2-}$ ,  $C_2O_4^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$  y otras especies orgánicas. Este mecanismo es el más usado, porque evita los sobrepotenciales y genera una ECL intensa y eficiente. En la [Figura 1.32](#) se esquematizan procesos ECL catódicos y anódicos (aunque sin tener en cuenta los procesos superficiales).

En otro sentido, los QDs también presentan propiedades de fotoelectroquímica (PEC)<sup>146</sup>. En un experimento básico ([Figura 1.32](#)), los QDs son inmovilizados en una superficie electroquímica, que forma una capa bastante aislante, inhibiendo las conversiones electroquímicas de las especies en disolución. A continuación, se ilumina la superficie electroquímica, que causa la excitación de los QDs y se generan pares electrón-hueco, que pueden producir una transferencia electrónica hacia o desde el electrodo (fotocorriente). Dependiendo del potencial aplicado, puede darse la transferencia electrónica del electrodo hacia los QDs o desde los QDs al electrodo. La diferencia de energía entre los niveles de Fermi ( $E_F$ ) del electrodo y de los QDs determina la dirección de la transferencia electrónica entre ellos<sup>147</sup>. Estos niveles pueden ser modificados por el potencial aplicado. El  $E_F$  es la energía a la cual la probabilidad de que un nivel energético esté ocupado por un electrón es del 50%. En los QDs típicos, esta energía se encuentra aproximadamente en el medio de la *band-gap* (entre la banda de conducción y banda de valencia). La presencia de otras especies que pueden actuar como donantes o aceptores de electrones/huecos es importante para neutralizar los QDs excitados y, además, puede aumentar la magnitud de la fotocorriente generada.

#### *Marca electroquímica de bioensayos*

Los QDs pueden ser utilizados como marca de bioensayos como alternativa a otras nanopartículas metálicas, por ejemplo AuNPs o AgNPs. Tres estrategias pueden ser utilizadas para la detección de QDs en biosensores:

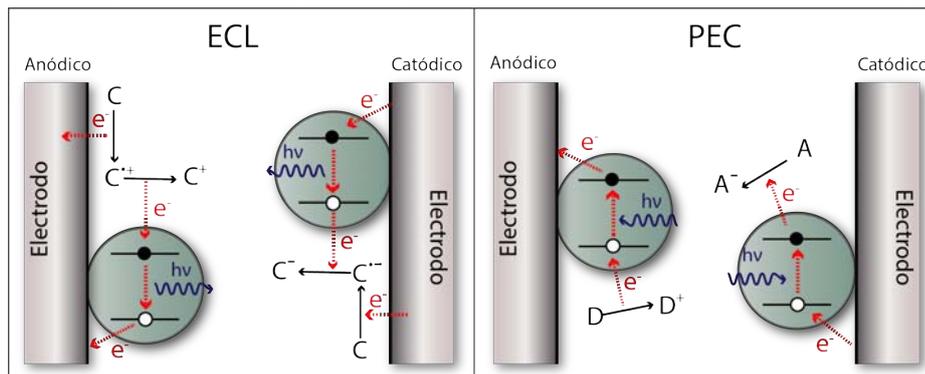


Figura 1.32: Esquemas del mecanismo de las propiedades ECL y PEC de los QDs.

- si el enlace de reconocimiento lleva a los QDs a una posición cercana al electrodo, una fotocorriente puede ser generada<sup>148</sup>, es decir, la detección se llevaría a cabo por sus propiedades fotoelectroquímicas<sup>149</sup>.
- las propiedades electroquimioluminiscentes de los QDs pueden también ser utilizadas para su detección en biosensores, ya que la cantidad de luz emitida depende del número de QDs.
- mediante la detección voltamperométrica de los metales que contienen los QDs, generalmente, tras su disolución.

Esta última estrategia es la más utilizada por la posibilidad de obtener una señal amplificada debido al elevado número de átomos metálicos que contiene cada partícula. La mayor ventaja que presentan los QDs en comparación a otras partículas metálicas es la facilidad para usarse en estrategias de detección multianalito debido a los diferentes materiales con que se pueden sintetizar, por ejemplo Cd, Pb, Zn, In o Cu. Estos metales se oxidan a diferentes potenciales en medidas voltamperométricas por lo que pueden ser resueltos y utilizarse para detección multianalito.

La metodología más utilizada para llevar a cabo la detección de QDs en bioensayos se describe a continuación y se ilustra en la [Figura 1.33](#):

- 1) Se realiza el bioensayo heterogéneo en alguna superficie sólida, ya sea en la superficie de pocillos de placas, electrodos o en partículas magnéticas. Se lleva a cabo la reacción de reconocimiento, normalmente en un esquema de tipo sandwich.
- 2) A continuación, se realiza un ataque ácido (con HCl o HNO<sub>3</sub>) para digerir las nanopartículas y liberar los cationes metálicos a la disolución.

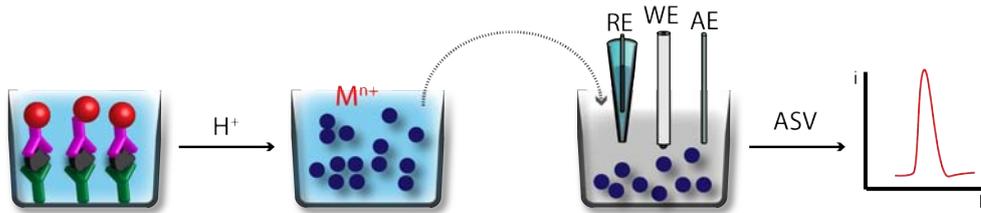


Figura 1.33: Bioensayo típico realizado cuando se utilizan QDs como marca de detección electroquímica.

3) Se transfiere parte de esa disolución ácida a una nueva celda electroquímica (con la disolución reguladora necesaria) para llevar a cabo la detección metálica, normalmente mediante voltamperometría de redisolución anódica. Esta etapa se suele hacer en presencia de otro metal, como mercurio o bismuto, que puede generar una película preconcentrada sobre la superficie del electrodo. Típicamente, se han utilizado celdas electroquímicas convencionales, pero también electrodos serigrafiados<sup>150</sup> para hacer la detección.

Numerosas aplicaciones han sido descritas utilizando QDs como marca de detección de bioensayos, con la estrategia de detección del metal electroactivo, desde que Wang y Merkoçi en el año 2002<sup>151</sup> utilizaran CdS para detectar la hibridación en un ensayo con ácidos nucleicos, incluso demostraron como una precipitación química de Cd sobre las nanopartículas mejoraban considerablemente la señal obtenida tras la digestión con HNO<sub>3</sub>. En un trabajo publicado posteriormente, demostraron la posibilidad de utilizar QDs de diferentes materiales (CdS, ZnS, PbS) para la determinación simultánea de diferentes reacciones de hibridación de manera sencilla abriendo la puerta a la utilización de QDs para detección multianalito<sup>152</sup>. La utilización de QDs como marca de aptasensores (biosensores con aptámeros como receptor) también ha evidenciado su buen rendimiento en ensayos de este tipo para la detección moléculas pequeñas como trombina usando un ensayo competitivo entre el analito y el analito marcado<sup>153</sup>. La detección directa de CdS sobre electrodos serigrafiados sin realizar la digestión ácida se evaluó para la detección de ADN relacionado con la fibrosis quística, tras la unión de los QDs al extremo de una hebra de detección conteniendo grupos -SH en un ensayo magnético<sup>154</sup>. Una estrategia interesante ha sido la utilización de dispositivos flexibles portables para llevar a cabo la detección de QDs dentro de los mismos pocillos donde se lleva a cabo la reacción biológica<sup>155</sup>. De la misma forma, el uso de QDs en inmunoensayos también ha mostrado grandes resultados, en ensayos para detectar una sola especie o para detección multianalito de hasta cuatro proteínas diferentes utilizando QDs de ZnS, CdS, PbS y CuS<sup>156</sup>. Aunque típicamente la detección de

QDs se hace con técnicas voltamperométricas, la detección potenciométrica en inmunoensayos también ha sido descrita evitando un cambio drástico en el pH al hacer la digestión de los QDs con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>157</sup>. En la literatura se pueden encontrar otros ejemplos de detección de proteínas mediante inmunoensayos con detección de QDs<sup>158,159</sup> o incluso utilizados para la detección de bacterias<sup>160</sup>. Las últimas tendencias en la utilización de QDs como marca es su unión a un vehículo capaz de contener varias nanopartículas en su estructura, algo que podría mejorar la detección por una señal amplificada. Algunos ejemplos son la utilización de estructuras dendrímeras<sup>161</sup> o encapsulación en liposomas<sup>162</sup> o en nanopartículas huecas<sup>163</sup>. Por otro lado, los QDs pueden también ser utilizados como marca de tiras de flujo lateral debido, principalmente, a sus características fluorescentes<sup>164</sup>, pero la detección electroquímica integrada en estos dispositivos también ha sido descrita<sup>165</sup>.

Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, este tipo de bioensayos descritos con QDs no se pueden considerar biosensores electroquímicos, ya que el transductor y el elemento de reconocimiento no están integrados entre sí. Realmente, en estos casos, no existe un transductor, solamente un detector electroquímico de los iones metálicos que fueron previamente liberados en la disolución. La reacción de reconocimiento y la detección de la marca son procesos totalmente independientes. Además, es un proceso complejo, que consta de varias etapas, con la transferencia de la disolución de la zona de reacción hasta el detector, por lo que pierde muchas de las características ideales de un dispositivo POC. La razón por la que no se ha descrito anteriormente en la literatura un biosensor integrado en el que el transductor funcione como soporte de la reacción de reconocimiento y, además, como detector electroquímico de los QDs es una incógnita, pero podría simplificar en gran medida la utilización de QDs como marca.

### 1.3.3 *Nanopartículas de fosfato de titanio*

Los materiales porosos pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones debido a su elevada área superficial, tamaño de poro y estructura modificable y propiedades superficiales. Además de sus propiedades intrínsecas, se pueden funcionalizar con otro tipo de especies químicas que les proporcionen nuevas capacidades. En la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de nanomateriales porosos, entre los que destacan el carbono activado o las zeolitas. Según el tamaño de su poro, los materiales porosos se pueden dividir en tres grupos según la IUPAC: microporosos (< 2 nm), mesoporosos (2-50 nm) y macroporosos (> 50 nm). Diferentes nanomateriales micro/mesoporosos han sido des-

critos en los últimos años con algunas propiedades excelentes como un área superficial elevada, estructura ordenada o propiedades catalíticas<sup>166</sup>.

Los fosfatos metálicos se consideran un catalizador o soporte de catalizadores ideal, ya que la posibilidad de su precipitación permite una separación más sencilla y la capacidad de ser reciclados. Aunque su eficacia puede estar restringida por un área superficial poco eficaz y un tamaño de poro pequeño, el diseño de fosfatos metálicos nanoporosos con estructura abierta es una buena estrategia para mejorar estas características. Las aplicaciones más importantes de los fosfatos metálicos se encuentran en la catálisis<sup>167,168</sup>, intercambio iónico, conducción de protones<sup>169</sup>, refrigerantes magnéticos<sup>170</sup> o baterías de Li-ion<sup>171</sup>, entre otras.

Los fosfatos de titanio (TiP) han suscitado un gran interés como catalizador sólido ácido<sup>172,173,174</sup> o intercambiador de iones para eliminar metales pesados de muestras medioambientales<sup>175</sup>. En este sentido, se observó como los TiPs intercambiaban de manera más eficiente metales pesados como el  $Pb^{2+}$  en comparación a otros metales como  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  o  $Mg^{2+}$ <sup>176</sup>, probablemente debido a un efecto sinérgico de interacción electrostática y formación de complejos de esfera interna. Los TiPs presentan buenas características para este tipo de aplicación como son su baja solubilidad, alta capacidad de intercambio (estructura porosa), cinética de intercambio rápida, y mayor estabilidad térmica y resistencia en comparación a intercambiadores orgánicos<sup>177,178,179</sup>.

Muchos tipos de TiP han sido sintetizadas con la ayuda de surfactantes o moléculas orgánicas pequeñas<sup>180,181</sup>, mostrando diferentes propiedades físicas y estructurales. Por ejemplo, TiPs formados con pluronic-P123 como agente director de la estructura, presentan una forma jerarquizada formada por la unión de diferentes nanopartículas agregadas en una estructura superior, y presentaron una buena actividad catalítica asistida por microondas de biomasa y carbohidratos a 5-hidroximetilfurfural, intermedio clave en la producción de biofuel<sup>182</sup>. TiPs con estructura en capas<sup>183,184</sup>, mesoporosa<sup>185</sup> o de nanotubos<sup>186</sup>, también han sido descritos. Nanopartículas de fosfato de titanio (TiPNPs) fueron obtenidas usando ácidos nucleicos como agente director de la estructura<sup>173</sup>, aunque no es un método muy apropiado para la síntesis a gran escala. TiPNPs modificados con sílice mesoporosa con nanoporos ordenados fueron sintetizados siguiendo un método de *grafting*<sup>187</sup>. Sin embargo, estos métodos no parecen obtener una distribución de tamaños uniforme, con nanoporos abiertos y una buena dispersión en disoluciones acuosas.

Liu et al.<sup>188</sup> describieron un método fácil para la síntesis de TiPNPs de tipo *core-shell* con un área superficial elevada y nanoporos abiertos. Estas nanopartículas presentan un

núcleo cristalino (*core*) estable formado de  $\text{NaTi}_2(\text{PO}_4)_3$  y un recubrimiento (*shell*) amorfo con una distribución de tamaños uniforme. Las TiPNPs *core-shell* han demostrado presentar una alta actividad catalítica como ácido Bronsted y buena selectividad para reacciones de acetilación con un gran rendimiento. Estas nanopartículas tienen la ventaja de contener un núcleo cristalino muy estable, junto a un recubrimiento amorfo compuesto de fosfatos ácidos que pueden funcionar como intercambiadores iónicos. Este tipo de TiPNPs se sintetizan usando ácido ortofosfórico sólido y n-butóxido de titanio (IV) como precursores junto a un agente director de la estructura que puede ser una sal de docusato de sodio (AOT)<sup>188</sup> o dodecil sulfato sódico (SDS)<sup>189</sup>.<sup>12</sup> El análisis morfológico de estas nanopartículas muestra una estructura quasi-esférica con una dispersión de tamaños uniforme (alrededor de 50 nm) y un tamaño de poro entre 14-28 Å. Mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$ , se evidencia la presencia de grupos  $(\text{PO}_4)^{3-}$ ,  $(\text{HPO}_4)^{2-}$  y  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^{-}$ . Los estudios de calcinación y análisis termogravimétrico muestran que las TiPNPs son muy estables incluso después de ser tratadas a alta temperatura.

Los materiales porosos pueden tener diferentes funciones en un sistema biosensor, como por ejemplo, con el objetivo de inmovilizar el elemento de reconocimiento, como catalizador, o como marca de detección al introducir en su estructura especies indicadoras. Diferentes estrategias han sido empleadas para utilizar fosfatos metálicos como marca de biosensores electroquímicos. Las TiPNPs han sido empleadas como marca de inmunosensores electroquímicos, tras la introducción de  $\text{Cd}^{2+}$  en su estructura, para la detección de anticuerpos IgG humanos<sup>190</sup>. Un electrodo de carbono vítreo convencional fue empleado para llevar a cabo el bioensayo y la detección de los metales mediante voltamperometría de onda cuadrada sin llevar a cabo una preconcentración metálica o sin disolución ácida, reduciendo el tiempo de análisis en comparación a otro tipo de marcas metálicas. Siguiendo la misma estrategia, TiPNPs *core-shell* modificadas con  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  fueron empleadas para la detección multianalito de biomarcadores de cardiopatías como la troponina cardíaca I (CTnI) y la proteína cardíaca transportadora de ácidos grasos (h-FABP)<sup>189</sup>. La introducción de una alta cantidad de iones metálicos dentro de la estructura permite obtener una señal amplificada en comparación a una marca directa convencional. Estas mismas nanopartículas fueron utilizadas para la detección de microARN<sup>191</sup>. Otro tipo de TiPNPs con núcleo hueco fueron utilizadas como marca de detección tras la adhesión de AgNPs sobre su superficie y la realización de un bioensayo con partículas magnéticas para detección

<sup>12</sup> Por ser el método elegido para la síntesis de estas nanopartículas durante este trabajo, el procedimiento se describe de forma muy detallada en el [Capítulo 2](#)

de interleuquina-6<sup>192</sup> o fosfatos metálicos (cadmio, plomo o zinc) dentro de una estructura encapsulante formada por la proteína apoferritina también han sido evaluados como marca de detección<sup>193,194</sup>.

#### 1.4 ELECTROQUÍMICA DINÁMICA Y TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

En este apartado se va a introducir de una manera simple y pedagógica, la **Electroquímica dinámica** y las técnicas electroquímicas dinámicas más importantes utilizadas durante esta Tesis Doctoral. La electroquímica de equilibrio o control termodinámico, por ejemplo, las técnicas potenciométricas, estudia los procesos electroquímicos que ocurren cuando no se aplica una fuente de excitación externa, procesos en los que la velocidad total de la reacción es cero. La electroquímica dinámica estudia los procesos impulsados por la aplicación de una excitación externa, que causa una reacción electroquímica en una dirección específica, los reactivos son consumidos y se generan productos por una transferencia electrónica en la interfase electrodo/disolución. Considerando la aplicación de una excitación que perturbe el equilibrio de una especie electroactiva en disolución, dos procesos redox pueden ocurrir: oxidación y reducción. En un proceso de reducción, el electrodo proporciona electrones a la especie, y en un proceso de oxidación, la especie proporciona electrones al electrodo. Las diferentes posibilidades de la magnitud y tipo de fuente de excitación determinan las técnicas electroquímicas.

Dos aspectos generales deben ser tenidos en cuenta en una reacción electroquímica, como en cualquier otra reacción química: la termodinámica y la cinética. La termodinámica de las reacciones electroquímicas viene determinada (de manera muy simplificada) por la ecuación de Nernst (ecuación 1.12), donde  $\Delta G$  es la energía libre de Gibbs,  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $F$  la constante de Faraday y  $E$  es la diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos de la celda electroquímica<sup>13</sup>. Esta ecuación predice la energía máxima que puede ser obtenida desde una reacción electroquímica espontánea (si la energía libre es negativa,  $\Delta G < 0$ ) o la energía libre mínima requerida para llevar a cabo la reacción (si la energía libre es mayor que cero). En el primer caso, la reacción electroquímica espontánea es capaz de generar energía, fundamento de las baterías (celdas galvánicas), mientras que en el segundo caso, es necesaria la aplicación de una energía para llevar a cabo la reacción electroquímica, es decir la electrólisis (celdas electrolíticas). En este texto, solamente se considera este último caso, ya que son las técnicas que se utilizan. En este sentido, la generación de una diferencia de potenciales es la fuerza impulsora de la transferencia electrónica entre un electrodo y la especie en disolución, y su magnitud (teniendo en cuenta los niveles energéticos de la especie de interés) determina la dirección de la

---

<sup>13</sup> Más información sobre instrumentación y diseños de celdas electroquímicas se puede encontrar en el [Capítulo A](#).

transferencia electrónica. Las reacciones que se producen en la interfase electrodo/disolución están gobernadas por las leyes de Faraday (ver [Capítulo A](#)). Hay que considerar que en el electrodo opuesto de la celda, una reacción electroquímica contraria debe ocurrir. Cada una de estas reacciones de manera individual, se llaman semirreacciones. Normalmente, la semirreacción de interés es la que se produce en el electrodo de trabajo.

$$\Delta G = -nFE \quad (1.12)$$

La energía libre de Gibbs puede relacionarse con el equilibrio de una reacción química<sup>14</sup> y de manera análoga, la diferencia de potencial con un equilibrio de una reacción electroquímica según la ecuación 1.14, donde  $E^0$  es el potencial formal de la reacción redox,  $R$  es la constante universal de los gases y  $[O]$  y  $[R]$  son las concentraciones de las especies del par redox. La reacción electroquímica ejemplo que se considera en estas explicaciones es la compuesta por un hipotético par redox O/R y descrita en la ecuación 1.13, donde  $k_{red}$  es la constante de velocidad heterogénea de la reducción y  $k_{ox}$  es la constante de velocidad heterogénea de la oxidación. La ecuación de Nernst indica que el equilibrio de las especies redox puede ser desplazado tras la aplicación de un potencial diferente a  $E^0$  (que generalmente, coincide con el potencial de equilibrio,  $E_{eq}$ ), es decir, la aplicación de un sobrepotencial.



$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]}{[O]} \quad (1.14)$$

Por otro lado, la cinética estudia la velocidad de la reacción electroquímica, que puede consistir en la velocidad de la transferencia electrónica u otros procesos involucrados antes o después de la ET. El estudio de la cinética de las reacciones electroquímicas es un tema complejo que puede ser revisado en textos especializados, pero a continuación se describen los fundamentos y ecuaciones más importantes. La velocidad de una reacción electroquímica global ( $v$ ) viene determinada por la corriente total intercambiada según  $i = i_{red} - i_{ox} = nFAv$ , y esta velocidad global dependerá de las constantes específicas según  $v = k_{red}[R] + k_{ox}[O]$ . En un sistema en equilibrio dinámico, la corriente global y la velocidad global de la reacción es cero ( $i = 0$ ,  $v = 0$ ), y por tanto  $k_{red}/k_{ox} = K = [R]/[O]$ ,

<sup>14</sup> Según la ecuación:  $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$

mientras que la velocidad de las reacciones de reducción y oxidación es la misma. La ecuación de Arrhenius relaciona la velocidad de una reacción química con la energía libre de Gibbs de activación:  $k = Z \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right)$ , energía que es la diferencia entre el estado inicial y el estado de transición, según se ilustra en el perfil de coordenadas mostrado en la [Figura 1.26](#). Las constantes de velocidad  $k_{red}$  y  $k_{ox}$  dependen del sobrepotencial aplicado en la celda, mientras que en el equilibrio son iguales y vienen representadas por  $k_{red} = k_{ox} = k^\circ$ , donde  $k^\circ$  es la constante estándar de velocidad. Para sistemas fuera del equilibrio, las constantes vienen determinadas por las siguientes ecuaciones, donde  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia electrónica que refleja la naturaleza del estado de transición ( $\alpha$  cercano a cero cuando el estado de transición se parece a los reactivos, y  $\alpha$  cercano a uno cuando el estado de transición se parece a los productos), típicamente se asume  $\alpha = 0.5$ , especialmente para reacciones de esfera externa,  $E^\circ$  es el potencial formal del sistema redox, que normalmente es constante en unas condiciones experimentales similares para un sistema redox específico, y la diferencia con el potencial aplicado ( $E$ ) es el sobrepotencial.

$$k_{red} = k^\circ \exp\left(\frac{-\alpha F(E - E^\circ)}{RT}\right) \quad (1.15)$$

$$k_{ox} = k^\circ \exp\left(\frac{(1 - \alpha) F(E - E^\circ)}{RT}\right) \quad (1.16)$$

La constante  $k^\circ$  puede emplearse para expresar la constante de velocidad a potenciales que se desvían del potencial de equilibrio, y mide la facilidad de una reacción de un sistema redox (valores altos de  $k^\circ$ , reacción rápida, valores bajos de  $k^\circ$ , reacción lenta). La ecuación de Butler-Volmer (ecuación 1.17) relaciona la corriente y las constantes de velocidad. Esta ecuación, para sistemas en equilibrio ( $i = 0$ ) resulta en la ecuación de Nernst. En estas condiciones, aunque la corriente global es cero, las corrientes de cada reacción pueden no ser cero, y tienen el mismo valor con signo contrario. Esta magnitud es la llamada corriente de intercambio ( $i_0 = i_{red} = i_{ox}$ ), y puede relacionarse con la  $k^\circ$  según la ecuación 1.18. La  $i_0$  puede ser normalizada por la unidad de área para proporcionar la densidad de corriente de intercambio ( $j_0 = i_0/A$ ). La corriente proporciona información sobre la cantidad de reactivos consumidos/generados en la reacción según las leyes de Faraday, mientras que la densidad de corriente proporciona información sobre la velocidad de reacción.

$$i = i_{red} - i_{ox} = nFAk^o \left[ [O] \exp \frac{-\alpha(E - E^o)}{RT} - [R] \frac{(1 - \alpha) F (E - E^o)}{RT} \right] \quad (1.17)$$

$$i_0 = nFk^o [O]^{(1-\alpha)} [R]^\alpha \quad (1.18)$$

Por otro lado, la corriente global también puede ser expresada en función de la corriente de intercambio según la ecuación 1.19, donde  $[O]^*$  y  $[R]^*$  son las concentración de las especies en el seno de la disolución, y  $\eta$  es el sobrepotencial ( $E - E^o$ ). Si la concentración superficial en la interfase electrodo/disolución de estas especies no varía de forma apreciable en relación a su concentración en disolución (pequeñas corrientes, sobrepotenciales pequeños), los efectos de la transferencia de masa (limitaciones por difusión) pueden ser omitidos y se obtendría la ecuación 1.20.

$$i = i_0 \left[ \frac{[O]}{[O]^*} \exp \frac{-\alpha F \eta}{RT} - \frac{[R]}{[R]^*} \exp \frac{(1 - \alpha) F \eta}{RT} \right] \quad (1.19)$$

$$i = i_0 \left[ \exp \frac{-\alpha F \eta}{RT} - \exp \frac{(1 - \alpha) F \eta}{RT} \right] \quad (1.20)$$

En casos donde se aplique un sobrepotencial muy elevado (en absoluto), uno de los términos de la ecuación de Butler-Volmer se hace despreciable. Por ejemplo, a sobrepotenciales negativos ( $\exp(-\alpha F \eta) \gg \exp((1 - \alpha) F \eta)$ ) y la ecuación se convierte en la ecuación:

$$\eta = \frac{RT}{\alpha F} \ln i_0 - \frac{RT}{\alpha F} \ln i \quad (1.21)$$

Esta ecuación es de la misma forma que la ecuación de Tafel, que predice una relación exponencial entre la corriente y el sobrepotencial ( $\eta = a + b \log i$ ), y las constantes de Tafel (a y b) se pueden escribir de la siguiente manera:

$$a = \frac{2,3RT}{\alpha F \log i_0} \quad (1.22)$$

$$b = \frac{-2,3RT}{\alpha F \log i_0} \quad (1.23)$$

Estas ecuaciones suelen ser válidas (el comportamiento experimental se ajusta a ellas) cuando la cinética de la reacción es lenta y los sobrepotenciales aplicados altos, y permiten obtener información sobre parámetros cinéticos de la reacción, por ejemplo, al extrapolar

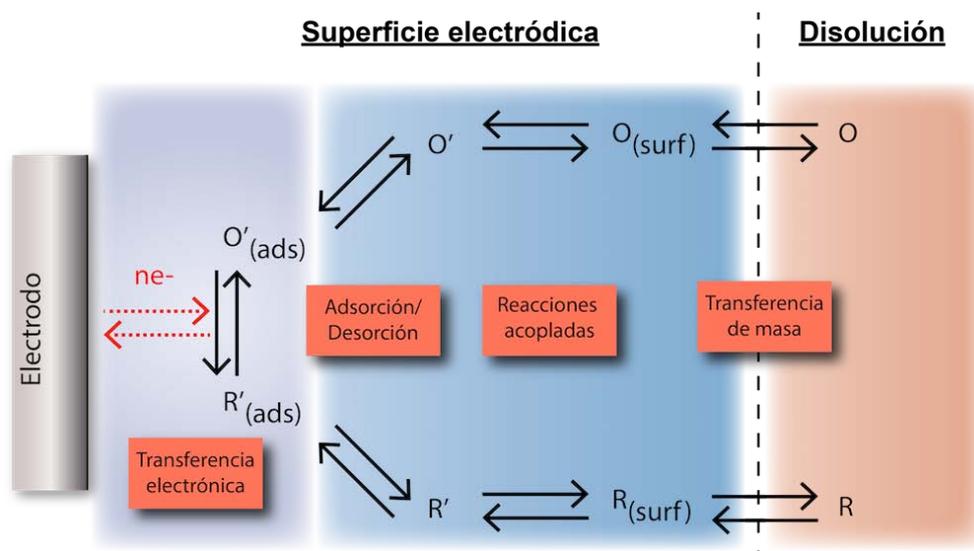


Figura 1.34: Etapas típicas de una reacción electroquímica global.

el segmento lineal se puede obtener  $a$ , que indica el orden de reacción del paso determinante de la transferencia electrónica, y  $i_0$  a partir de la intersección del  $\log i$ , además de  $\alpha$ .

#### Transporte de masa

Una reacción electroquímica puede consistir en diferentes etapas (Figura 1.34), más o menos complejas, que se enumeran a continuación:

- Transferencia de masa de la especie electroactiva desde el seno de la disolución a la superficie electródica.
- Transferencia electrónica en la interfase electrodo/disolución entre la especie electroactiva y el electrodo.
- Transferencia de masa del producto de la reacción de transferencia electrónica hasta el seno de la disolución.
- En algunos casos puede producirse procesos de adsorción/desorción de las especies en la superficie electródica o reacciones químicas acopladas.

En las condiciones más típicas (sin procesos acoplados), la velocidad de una reacción electroquímica puede estar controlada por dos factores principales: la velocidad de la transferencia electrónica con el electrodo (limitada por cinética), o por la velocidad a la

que las especies se mueven en la disolución hacia (y desde) la superficie electródica (limitada por la transferencia de masa). Ambos procesos se producen, pero uno de ellos tendrá un impacto más significativo en la velocidad total de la reacción electroquímica. Una reacción electroquímica que está limitada por la transferencia de masa, es decir, la velocidad de transferencia electrónica es alta, es una reacción reversible (sigue la ecuación de Nernst, y el equilibrio termodinámico es establecido rápidamente tras la aplicación del sobrepotencial). Mientras que si la reacción está limitada por cinética, es decir, la velocidad de la transferencia electrónica es lenta, se llama un proceso irreversible (o quasi-reversible, para casos muy especiales). En este caso, el comportamiento entre el potencial y la distribución de concentraciones del par redox se desvía de la ecuación de Nernst, se necesita un sobrepotencial mayor y se requiere de mayor tiempo para restablecer el equilibrio termodinámico.

La transferencia de masa en una celda electroquímica puede estar compuesta por tres factores:

1. **Convección:** es el movimiento de especies debido a una fuerza mecánica, externa o natural. La convección por medios externos se realiza mediante la agitación de la disolución, que puede ser útil en algunos experimentos electroquímicos. La convección natural viene dada por diferencias de densidad en la disolución debidas a gradientes térmicos. Estos gradientes se pueden generar si el experimento electroquímico supone un largo tiempo. En general, con electrodos serigrafiados se suele trabajar en reposo, de modo que la convección no afecta a la transferencia de masa global.
2. **Migración:** es el movimiento de especies cargadas debido a un gradiente de potenciales. Si se utiliza un electrolito de fondo inerte en gran exceso, la influencia de este transporte de masa en la especie redox de interés se suprime (es decir, esta especie no migra en la disolución). Además, este electrolito de fondo también disminuye la resistencia de la disolución y la caída óhmica (explicada en el [Capítulo A](#)).
3. **Difusión:** es el movimiento de las especies generado por un gradiente de concentraciones, es decir, una diferencia de concentraciones en dos zonas diferentes de la disolución (la especie difunde desde una zona con una mayor concentración hacia una zona con menor concentración). La difusión es un proceso muy estudiado que viene regido por las leyes de Fick. La primera ley de Fick describe la magnitud del flujo asociado (ecuación 1.24). La segunda ley de Fick describe el cambio en la con-

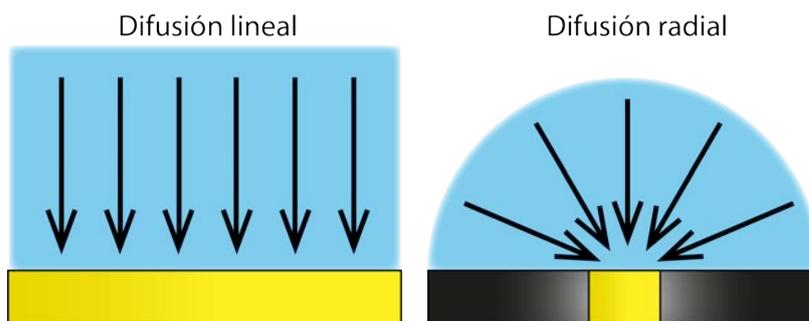


Figura 1.35: Esquema del perfil de una difusión lineal en un macroelectrodo y de una difusión radial en un microelectrodo.

centración de una especie en función del tiempo, según la ecuación 1.25. Estas leyes van a determinar tanto el flujo de corriente generado en un experimento como el perfil de concentraciones de las especies redox, en la interfase electrodo/disolución, que sufran una reacción electroquímica limitada por difusión.

$$j_O = -D_O \frac{\partial [O]}{\partial x} \quad (1.24)$$

$$\frac{\partial c_O}{\partial t} = D_O \left( \frac{\partial^2 c_O}{\partial x^2} \right) \quad (1.25)$$

En los experimentos electroquímicos más empleados, la migración y la convección pueden minimizarse al trabajar en una disolución con una alta concentración de electrolito de fondo y en reposo. Por tanto, en estas condiciones, el único factor que influye en la transferencia de masa es la difusión. Cabe mencionar que existen diferentes tipos de difusión que pueden tener un efecto importante en la transferencia de masa (aunque ya han sido mencionados anteriormente en el texto). Los dos tipos de difusión más frecuentes son la difusión lineal y la difusión radial, esquematizadas en la Figura 1.35. En la difusión lineal, la trayectoria de la difusión es paralela y perpendicular a la superficie electródica. La difusión lineal es típica de macroelectrodos planos, como los electrodos serigrafados. Sin embargo, para electrodos de otras geometrías como cilíndricos o esféricos, la trayectoria de la difusión no es paralela sino convergente, pero si el espesor de la capa de difusión es despreciable en comparación al diámetro electródico (normalmente, para electrodos de más de 1 mm), la difusión se comporta de manera lineal.

### *Transferencia electrónica*

La velocidad de la transferencia electrónica se ve afectada por etapas previas antes de la transferencia en sí, por ejemplo, el reordenamiento de la capa iónica en la interfase electrodo/disolución, la reorientación de los dipolos del disolvente y cambios en la longitud de enlace del ion central y los ligandos de la especie redox. La teoría de transferencia electrónica más empleada en la actualidad es la de Marcus. La transferencia electrónica (ET) puede clasificarse como de esfera externa y de esfera interna. Las reacciones de esfera externa involucran cambios estructurales mínimos, ya que no existe una fuerte interacción entre la especie redox con la superficie electródica, y las especies mantienen su capa de solvatación. En las reacciones de esfera interna se pueden producir grandes cambios en la longitud de enlace o la geometría de la capa de solvatación ya que la especie redox interacciona fuertemente con la superficie electródica, normalmente por adsorción tras la eliminación de la capa de solvatación. Por tanto, este tipo de procesos suelen depender en mayor medida de la estructura y naturaleza electrónica del material electródico. En cualquiera de los dos casos, las especies redox tienen que estar en una posición cercana a la superficie electródica para que se produzca el efecto túnel entre el electrodo y las especies en disolución (normalmente entre 1-3 nm) que resulta en la transferencia electrónica, y además, los cambios nucleares o de reorganización deben producirse antes o después de la ET, según determina el principio de Franck-Condon. La velocidad de la ET varía entre las diferentes especies redox debido al requerimiento de la especie oxidada y reducida de compartir la misma energía nuclear inmediatamente antes y después de la ET. Por este motivo, cuando el estado reducido y oxidado son similares en estructura, la energía de reorganización es más pequeña y las reacciones electroquímicas son más rápidas. Por otro lado, cuando se requieren cambios estructurales significativos para que la especie oxidada y reducida compartan la misma energía nuclear, la velocidad de la ET es menor. Según se esquematiza en la [Figura 1.36](#), en un electrodo metálico sólido, en condiciones normales, la ET se produce fácilmente en el nivel Fermi<sup>15</sup> por la superposición de las bandas de conducción (CB) y de valencia (VB) (la parte superior de la VB tiene mayor energía que el extremo inferior de la CB). La aplicación de un potencial desplaza la energía del nivel Fermi en el electrodo, alterando la relación energética entre los DOS (densidad de estados) del electrodo y el potencial redox de la especie. En ese caso, se produce una transferencia

---

<sup>15</sup> El nivel Fermi en un material conductor se encuentra en la mitad entre el extremo superior de la banda de valencia y el extremo inferior de la banda de conducción, por lo que la superposición de bandas hace que el  $E_F$  se encuentre dentro de ambas bandas.

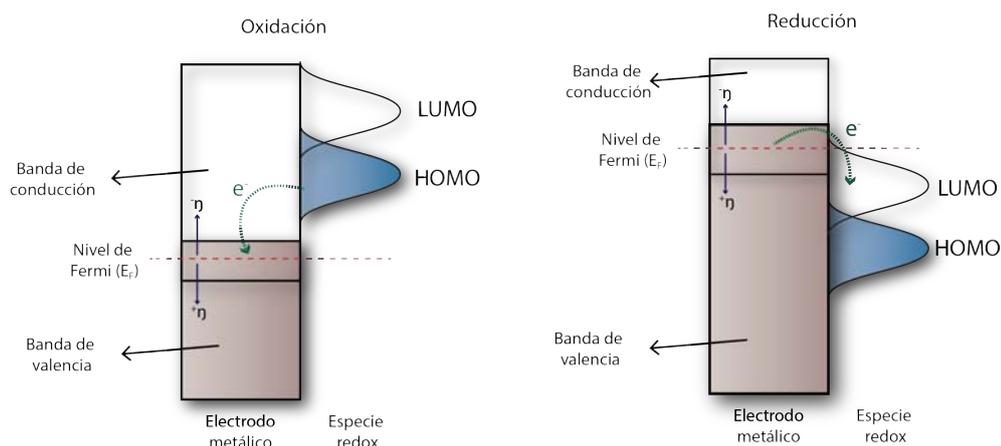


Figura 1.36: Esquema energético de la transferencia electrónica entre un electrodo y una especie redox.

de carga para equilibrar la energía entre el nivel Fermi del electrodo y el potencial redox de la especie en disolución (y de paso equilibrar la reacción redox). Con un potencial negativo, el nivel Fermi se desplaza a una energía superior (densidad de estados ocupados de mayor energía), por lo que puede ocurrir la ET desde los DOS ocupados del electrodo a los orbitales LUMO de la especie redox (reducción). De forma contraria, con la aplicación de un potencial positivo, la energía del nivel Fermi se desplaza a valores menores, por lo que se puede producir la ET desde los electrones del HOMO de la especie redox (de mayor energía) hacia los DOS vacíos del electrodo (oxidación). En el caso de un electrodo semiconductor, el *bandgap* que existe entre la CB y la VB, hace que la ET no se produzca al nivel Fermi (que estaría en una zona intermedia del *bandgap*), sino que depende de la VB (para reducción) y de la CB (para oxidación), algo que se traduce en una menor velocidad de ET.

### *Doble capa eléctrica*

El flujo total de electrones en una celda electroquímica puede tener dos componentes principales: la corriente que genera la reacción electroquímica de interés (llamado proceso faradaico ya que sigue las leyes de Faraday) y otra componente, llamada corriente capacitiva o de carga ( $i_c$ ), que no está siendo usada para generar la reacción electroquímica (corriente no faradaica). Para explicar el origen de la  $i_c$  es necesario considerar la distribución de cargas en la interfase electrodo/disolución. Tras la aplicación de un potencial, la superficie del electrodo de trabajo se carga y se produce una reorganización de las cargas eléctricas de la disolución para mantener el balance neutro en la interfase. Iones

presentes en la disolución migran para compensar la densidad de carga local de la superficie. Este proceso genera un flujo de corriente no faradaica por la similitud de la interfase electrodo/disolución a un condensador eléctrico. Como el sistema de medida no puede separar las corrientes según su naturaleza, la corriente medida será la suma de corriente faradaica y no faradaica. Las diferentes técnicas electroquímicas fueron desarrolladas con el objetivo de discriminar las diferentes componentes de la corriente. En la capa cargada de la disolución cercana a la interfase, al menos dos regiones pueden distinguirse (de ahí el nombre de doble capa eléctrica). Un modelo comúnmente utilizado es el modelo Gouy-Chapman-Stern, que se muestra en la [Figura 1.37](#). La primera capa en contacto cercano con el electrodo está formada de iones compactos solvatados por el disolvente con una carga contraria a la carga del electrodo. Los dipolos de las moléculas de agua también se encuentran orientados de forma determinada por el campo eléctrico. Esta capa cercana a la interfase electrodo/disolución es el llamado plano interno de Helmholtz (IHP) o capa compacta. En la segunda capa, más alejada, las fuerzas electrostáticas son más débiles y la distribución iónica está afectada por la agitación térmica aleatoria. Esta segunda capa se llama plano externo de Helmholtz (OHP) o capa difusa. Se compone, principalmente, de iones hidratados de carga contraria al electrodo, aunque ya puede encontrarse algún ion de la misma carga que el electrodo, y que interactúan por fuerzas electrostáticas de largo alcance. El exceso de carga de esta capa disminuye gradualmente con la distancia al electrodo hasta llegar al seno de la disolución. El tamaño de la capa compacta es similar al tamaño de iones hidratados (unos pocos angstroms), mientras que la capa difusa puede llegar a tener una longitud de nanómetros.

Este modelo de la doble capa eléctrica puede equipararse al funcionamiento de un condensador eléctrico de placas paralelas, donde las moléculas de disolvente hacen la función de dieléctrico. Por tanto, parte de la corriente aplicada en la celda electroquímica es utilizada para cargar el condensador y no para llevar a cabo la reacción electroquímica. Si se asume este modelo, se puede obtener una expresión para la corriente capacitiva que viene dada por la derivada temporal de la carga del condensador según la ecuación [1.26](#), donde la  $Q_M$  es la carga del condensador que es similar a la presente en la superficie electródica. Cambiando estas variables por otras equivalentes se obtiene una expresión (ecuación [1.27](#)) que muestra el efecto en la  $i_c$  de la variación del área electródica ( $A$ , primer término), el potencial aplicado ( $\Delta E_e$ , segundo término) y la constante dieléctrica ( $\epsilon_d$ , tercer término), donde  $l$  es la distancia entre placas del condensador. Cuando se usan electrodos sólidos el área suele ser constante, por lo que el primer término puede descartarse. En electroquímica

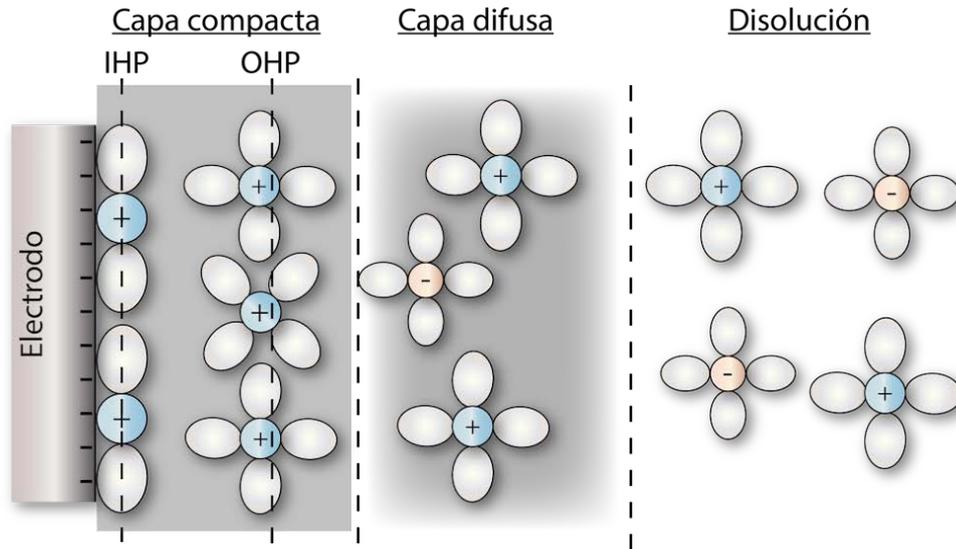


Figura 1.37: Esquema de la doble capa eléctrica según el modelo de Gouy-Chapman-Stern.

ca dinámica se suele producir un cambio en el potencial, por lo que el segundo término debe ser considerado. La constante dieléctrica puede cambiar si existe la adsorción de alguna especie que desplace las moléculas de disolvente de la superficie electródica.

$$i_c = \frac{dQ_M}{dt} \quad (1.26)$$

$$i_c = \left[ \varepsilon_d \Delta E_e \left( \frac{\partial A}{\partial t} \right)_{\varepsilon_d, \Delta E_e} + A \varepsilon_d \left( \frac{\partial (\Delta E_e)}{\partial t} \right)_{A, \varepsilon_d} + A \Delta E_e \left( \frac{\partial \varepsilon_d}{\partial t} \right)_{A, \Delta E_e} \right] \frac{1}{l} \quad (1.27)$$

#### 1.4.1 Técnicas voltamperométricas

En las técnicas voltamperométricas se evalúa el cambio en la corriente tras aplicar un barrido de potenciales, es decir, el potencial aplicado varía en función del tiempo. Este barrido de potenciales puede tener diferentes formas, que son la base de las diferentes técnicas voltamperométricas, de las que se describen a continuación: la voltamperometría lineal y cíclica (LSV y CV), la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) y la voltamperometría de onda cuadrada (SWV), que son las técnicas más utilizadas en esta Tesis Doctoral. Como, además, se utilizan electrodos serigrafados como base de todos los experimentos electroquímicos, la discusión y ecuaciones presentadas de estas técnicas vienen dadas para electrodos sólidos con una superficie plana en una disolución en reposo.

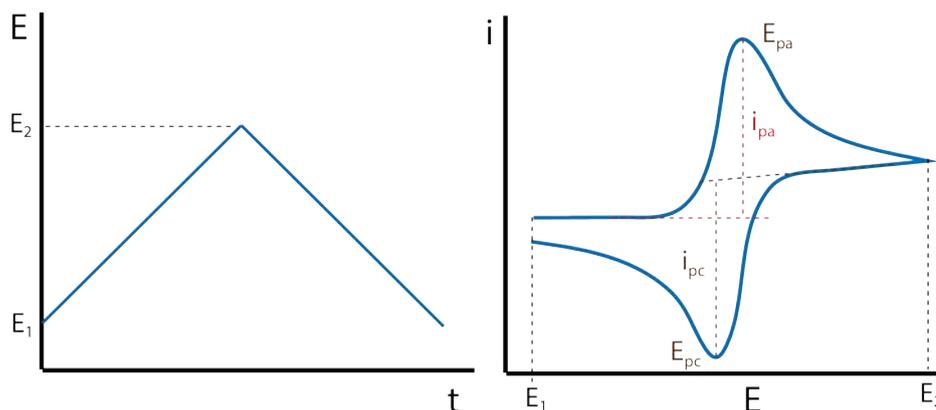


Figura 1.38: Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría cíclica.

#### 1.4.1.1 Voltamperometría lineal y cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es la técnica electroquímica más utilizada con el objetivo de obtener información cualitativa y cuantitativa de la cinética y termodinámica de las reacciones electroquímicas que ocurren en la superficie electródica. La CV registra la respuesta de corriente como una función del potencial aplicado con una forma de onda triangular desde un potencial inicial elegido para que no ocurra ninguna reacción electroquímica hasta un potencial final que sobrepase el potencial de equilibrio de la especie de interés (Figura 1.38). En el barrido inverso, el producto generado puede experimentar la reacción contraria. La voltamperometría lineal (LSV) es una técnica similar a la CV cuya forma de excitación es sólo un barrido de potenciales lineal. A continuación, se considera solamente la CV, aunque la LSV tiene unos principios similares. Para explicar el comportamiento típico de una curva CV, en una disolución en reposo, la influencia del potencial en el equilibrio establecido en la interfase electrodo/disolución debe ser considerada.

Si el sistema redox considerado anteriormente ( $O + ne^- \rightleftharpoons R$ ) tiene una transferencia electrónica rápida en comparación a la velocidad de barrido del potencial aplicado, el equilibrio será establecido de acuerdo a la ecuación de Nernst (ecuación 1.14). De acuerdo a esta ecuación, cuando el potencial aplicado se acerca al potencial formal, el electrodo y las especies reactivas intercambian electrones y ocurrirá un cambio en el equilibrio de las especies en la interfase. El perfil de concentraciones varía en relación al sobrepotencial aplicado como se puede ver en la Figura 1.39. Como la concentración de las especies reactivas decrece en la interfase, una transferencia de masa a la superficie electródica ocurre a través de la capa de difusión. Según predice la primera ley de Fick, la corriente medida es proporcional al flujo de especies reactivas que está llegando al electrodo. Al

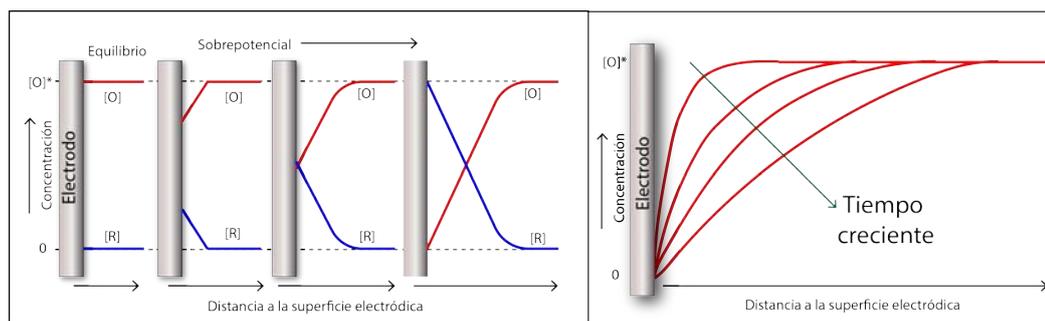


Figura 1.39: Perfil de concentraciones de un par redox en la interfase electrodo/disolución en función del sobrepotencial y del tiempo.

aplicar un sobrepotencial mayor, la transferencia de masa no es suficiente para rehacer el equilibrio rápidamente, lo que resulta en un defecto en la concentración de las especies reactivas en la interfase, y por tanto, en un decrecimiento del flujo de especies (y del flujo de corriente). Este es el motivo por el que, en condiciones normales, se obtienen curvas  $i$ - $E$  en forma de pico. Además, en este estadio, la velocidad de reacción depende de la velocidad de la transferencia de masa. Para reacciones electroquímicas con cinética lenta (quasi-reversibles o irreversibles), el potencial aplicado no causará la generación de las concentraciones de las especies predichas por la ecuación de Nernst, ya que el equilibrio no se establece rápidamente. Por tanto, es necesario la aplicación de un sobrepotencial mayor para regenerar el equilibrio. Este hecho conduce a un desplazamiento del voltamperograma en forma de pico a valores más lejanos de  $E^0$  que para reacciones rápidas. Además, como el restablecimiento del equilibrio depende de la velocidad de barrido, el desplazamiento es mayor con velocidades de barrido mayores. Existen diferentes parámetros de un voltamperograma cíclico que pueden ser utilizados con el objetivo de obtener información sobre un sistema redox o la superficie electrodo. Los más importantes son las corriente de pico de los procesos anódico y catódico ( $i_{pa}$ ,  $i_{pc}$ ), sus potenciales de pico ( $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ ) y la velocidad de barrido del potencial aplicado ( $v$ ).

La CV es una técnica muy útil para estudiar la reversibilidad (cinética) de un proceso electroquímico. La aplicación de la excitación en forma triangular permite cubrir potenciales que producen tanto la reducción como la oxidación de un sistema redox. Existen diferentes formas de estimar la reversibilidad de un proceso redox, aunque el experimento básico consiste en el registro de los voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido. Debe considerarse que una transferencia electrónica reversible a velocidades de barrido bajas puede llegar a ser irreversible a mayores velocidades de barrido ya que, como se

mencionó, el equilibrio nernstiano no puede ser mantenido a altas velocidades de barrido en la escala de tiempos del experimento. La diferencia entre los potenciales de pico del proceso anódico y catódico ( $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ ) puede ser utilizada para estimar la reversibilidad de un par redox. Para una transferencia electrónica reversible ideal, este valor es independiente de la velocidad de barrido según determina la ecuación de Nernst ( $\Delta E_p = 59/n$  mV, a 25 °C), donde  $n$  es el número de electrones intercambiados en la reacción. Este valor es un valor teórico que podría variar de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales utilizadas, por ejemplo, una contribución resistiva a la celda electroquímica. Sin embargo, en condiciones experimentales similares,  $\Delta E_p$  puede ser utilizado para comparar la cinética de diferentes sistemas redox o de diferentes electrodos con la misma especie redox. Normalmente, un valor menor de  $\Delta E_p$  indica una mayor reversibilidad (cinética más rápida) y mayores valores de  $\Delta E_p$  indican una menor reversibilidad (y, en estos casos, además,  $\Delta E_p$  suele aumentar al incrementar la velocidad de barrido). Otro parámetro interesante para estimar la reversibilidad de un sistema es la relación entre la corriente de pico anódica y catódica ( $i_{pa}/i_{pc}$ ). Si la especie generada en el barrido directo es estable en la escala de tiempos del experimento, las corrientes de pico deberían ser iguales (y la relación cercana a la unidad) y la transferencia electrónica es reversible en ambas direcciones (el equilibrio Nernstiano es rápidamente restablecido). La relación entre corrientes de pico puede estar fuertemente afectada por reacciones acopladas al principal proceso redox.

La reversibilidad electroquímica está relacionada con la velocidad de transferencia electrónica y puede proporcionar información cualitativa sobre la cinética de la reacción. Sin embargo, para cuantificar la velocidad de reacción para condiciones experimentales específicas, suele emplearse la constante heterogénea estándar de la velocidad,  $k^0$ . Diferentes métodos para estimar esta constante han sido descritos en la literatura. Sin embargo, el más utilizado es el método de Nicholson, en el que la  $\Delta E_p$  se relaciona a una función adimensional ( $\Psi$ ) y esta función a la constante de velocidad según la siguiente ecuación:

$$\Psi = k^0 \left( \frac{D_O}{D_R} \right)^{\frac{\alpha}{2}} (RT)^{1/2} (\pi n F D v)^{-1/2} \quad (1.28)$$

dónde  $D_O$  y  $D_R$  son los coeficientes de difusión de las especies redox ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia,  $R$  es la constante universal de los gases ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta (K),  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $F$  es la constante de Faraday ( $\text{C mol}^{-1}$ ) y  $v$  es la velocidad de barrido ( $\text{V s}^{-1}$ ). En general, si las especies no

experimentan cambios estructurales complejos en la reacción redox, la relación  $D_O/D_R$  puede ser aproximada a la unidad. Para estimar la función  $\Psi$ , Nicholson proporcionó una tabla relacionando su valor con el  $\Delta E_p$ , pero Swaddle et al. desarrollaron una ecuación que puede ser utilizada de manera general:  $\ln\Psi=3.69 - 1.16 \ln(\Delta E_p - 59)$ . En general, el método de Nicholson puede ser utilizado con reacciones semi-irreversibles (ya que no es válido para reacciones muy rápidas o muy lentas).

En general, para un proceso controlado por la difusión de las especies a la superficie electródica, la corriente de pico de la CV es proporcional a la velocidad de barrido de potenciales aplicado. Estas dos magnitudes se relacionan en una de las ecuaciones electroquímicas más conocidas, la ecuación 1.29, llamada ecuación de Randles-Sevcik (para un electrodo plano a 25° C y una reacción reversible). Además, el potencial de pico ( $E_p$ ) sigue la ecuación 1.30, donde la  $i_p$  es la intensidad de corriente de pico (A),  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $A$  es el área electródica ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  es la concentración de especie en disolución ( $\text{mol cm}^{-3}$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) y  $v$  es la velocidad de barrido ( $\text{V s}^{-1}$ ), y  $E_{1/2}$  es el potencial de semionda, que viene determinado por la ecuación 1.31 en un sistema reversible (y, de forma simplificada, puede determinarse por  $E_{1/2} = \frac{(E_{pa}+E_{pc})}{2}$ ). Para un sistema conocido, estas ecuaciones pueden utilizarse para obtener diferentes parámetros como, por ejemplo, el área electroactiva del electrodo ya que el resto de parámetros suele ser conocido. Este área electroactiva puede ser diferente al área geométrica del electrodo ya que, en la mayoría de los casos, los materiales no son completamente lisos, tienen diferentes grados de rugosidad, aumentando el área electródica o puede que no toda la superficie sea activa (por problemas estéricos, de pasivación, etc.).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (1.29)$$

$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} - \frac{28,5}{n} (mV) \quad (1.30)$$

$$E_{1/2} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_R}{D_O} \quad (1.31)$$

Para procesos irreversibles (cinética lenta), la corriente de pico también depende del coeficiente de transferencia electrónica ( $\alpha$ ), según la ecuación 1.32. El coeficiente de transferencia electrónica es un parámetro que depende de los estados de transición de la reacción

electroquímica, y normalmente, un valor de 0.5 es una buena aproximación. El potencial de pico ( $E_p$ ) del proceso también está controlado por diferentes parámetros según indica la ecuación 1.33, mostrando claramente su dependencia con la velocidad de barrido y la constante heterogénea de velocidad. Por otro lado, el potencial de semionda en estos sistemas es más difícil de analizar que para un sistema rápido, aunque tiene una dependencia de la velocidad de la transferencia, entre otros parámetros.

$$i_p = (2,99 \times 10^5) \alpha^{1/2} n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (1.32)$$

$$E_p = E^{o'} - \frac{RT}{\alpha n F} \left[ 0,780 + \ln \left( \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left( \frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (1.33)$$

El potencial formal de un par redox ( $E^{o'}$ ) puede ser también estimado utilizando las medidas CV, ya que  $E^{o'}$  puede estimarse con la siguiente ecuación:  $E^{o'} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ , que en casos reversibles es igual al  $E_{1/2}$ . La posición de  $E^{o'}$  es característico de un par redox en las condiciones experimentales utilizadas. Como  $E_p$  varía con la velocidad de barrido para un proceso irreversible, los resultados de  $E^{o'}$  deben ser extrapolados a velocidad de barrido cero para obtener el valor estimado.

Con la CV también se puede obtener información sobre la contribución de la doble capa eléctrica a la corriente total (midiendo la corriente capacitiva en las curvas  $i$ - $E$ , en ausencia de procesos faradaicos). Para hacer esto, se suelen registrar voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido pero solamente con disolución de electrolito de fondo, que es el principal responsable de la variación en la interfase electrodo/disolución. La corriente capacitiva en experimentos de CV está gobernada por la siguiente ecuación:  $i_c = A C_{dl} v$ , donde  $C_{dl}$  es la capacitancia de la doble capa ( $\mu\text{F cm}^{-2}$ ). Es interesante destacar que la  $i_p$  es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (para un proceso controlado por la difusión), mientras que la  $i_c$  es directamente proporcional a la velocidad de barrido. Este hecho indica que a mayores velocidades de barrido, la  $i_c$  contribuirá en mayor medida a la respuesta que a velocidades de barrido bajas.

Existen ciertos casos en que las condiciones de transporte de masa alcanzan un **estado estacionario**, por ejemplo, usando un electrodo de disco rotatorio (dónde la convección hidrodinámica controla la capa de difusión). Otro caso es utilizando un ultramicroelectrodo como electrodo de trabajo, en el que la contribución de la difusión radial es significativa (conduciendo en última estancia a un campo de difusión semiesférico) como se ilustra en la Figura 1.35. Este tipo de difusión produce un mayor flujo de especie redox al electrodo

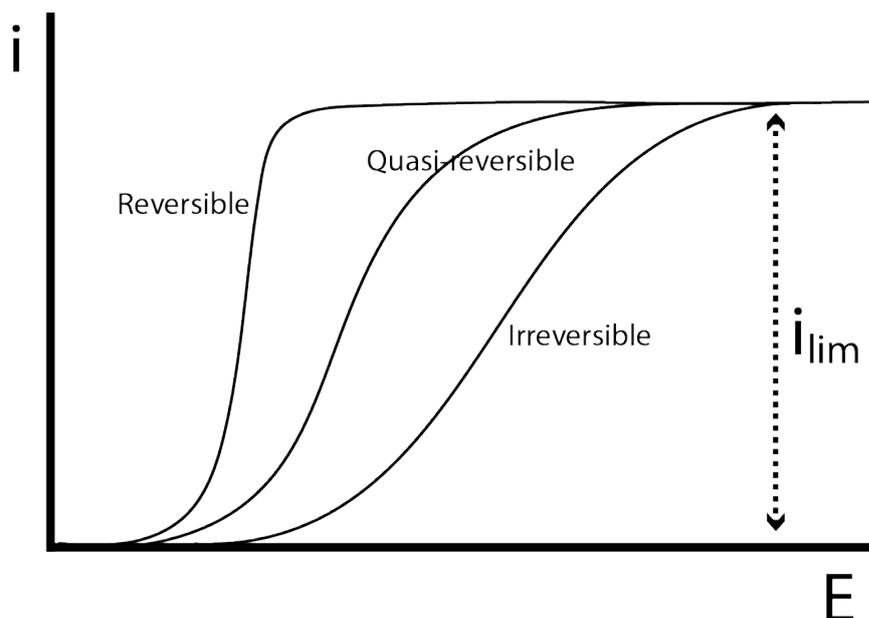


Figura 1.40: Curvas voltamperométricas típicas de sistema en estado estacionario. La pendiente de la curva depende de la velocidad de reacción.

debido a que la capa de difusión no varía con el tiempo, y por tanto, se suele obtener una mayor densidad de corriente. El restablecimiento de la especie reactiva en la interfase electrodo/disolución es rápido, se obtiene una corriente de estado estacionario y un voltamperograma cíclico (o lineal) en forma sigmoideal. La cinética de la reacción influye en la pendiente de la curva voltamperométrica sigmoideal como se muestra en la [Figura 1.40](#). Para un microelectrodo en forma de disco, la corriente límite de difusión ( $i_{lim}$ ) toma un valor determinado por la ecuación [1.34](#), donde  $r$  es el radio del electrodo. Una estrategia para evaluar la cinética en este tipo de voltamperogramas es con la relación  $|E_{3/4} - E_{1/2}|$ , que indica una especie de diferencia de potenciales ( $\Delta E_p$ ), y para la cual, un menor valor muestra una cinética más rápida.

$$i_{lim} = 4\pi nFDrC \quad (1.34)$$

La voltamperometría lineal o cíclica es una técnica muy eficaz para estudiar **procesos de adsorción** que pueden ocurrir en la superficie electródica, ya sean producidos por el reactivo o por el producto de la reacción electroquímica. En la [Figura 1.41](#) se muestra la voltamperometría cíclica para diferentes casos dónde existe adsorción fuerte de las especies involucradas en la reacción. En el primer caso, el reactivo está fuertemente adsorbido sobre la superficie, algo que resulta en una reacción menos favorable en comparación a la

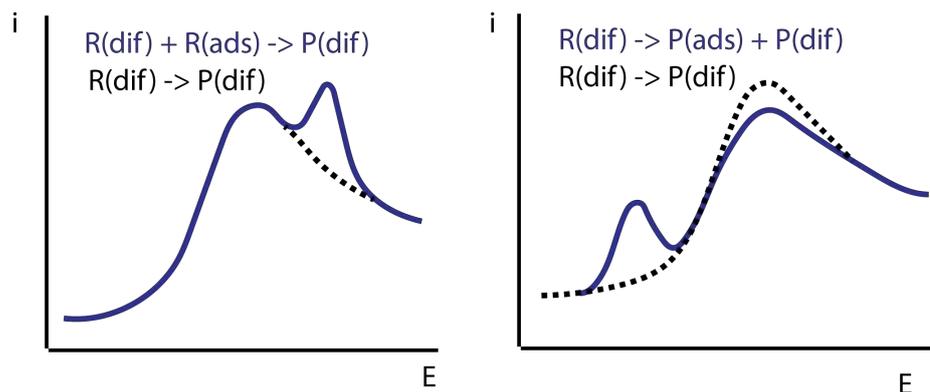


Figura 1.41: Respuesta voltamperométrica lineal para procesos de adsorción, donde el reactivo es adsorbido (primer caso) o el producto es adsorbido (segundo caso).

especie en disolución, ya que la adsorción estabiliza el reactivo y mayor energía es necesaria para llevarla a cabo. Esto resulta en la aparición de un proceso a un potencial posterior al proceso típico de difusión. En el segundo caso, el producto de la reacción se adsorbe, por lo que estará más estabilizado y una menor energía es necesaria para llevar a cabo la reacción. Esto se traduce en un pre-pico que aparece a un potencial menor al de la reacción de la especie en disolución. Para casos donde el reactivo o producto está débilmente adsorbido, la diferencia energética con el proceso redox de la especie en disolución es muy pequeña y, por tanto, no suele diferenciarse<sup>195</sup>.

Normalmente, los procesos de adsorción se pueden estudiar individualmente cuando se utilizan concentraciones bajas de los reactivos. Con concentraciones crecientes se pueden observar ambos procesos cuando se produce la saturación de la superficie electródica por las especies adsorbidas, hasta llegar al caso de concentraciones muy elevadas donde el proceso de difusión puede superponerse al proceso de adsorción (de menor corriente) si el potencial entre ambos es cercano. Por tanto, un estudio a diferentes concentraciones puede ser interesante con el objetivo de estudiar ambos procesos. En general, para procesos de adsorción con cinética reversible, la diferencia de potencial es menor que para un proceso de difusión, normalmente cercana a  $0$  V. Situaciones diferentes pueden darse para procesos de adsorción con cinética quasi-reversible o irreversible. La corriente de pico de los procesos de adsorción sigue una ecuación diferente a la de Randles-Sevcik (para difusión), que básicamente muestra su dependencia con la velocidad de barrido, área electródica y la concentración superficial de la especie adsorbida (ecuación 1.35), donde  $\Gamma^*$  es la concentración superficial de la especie adsorbida. El área del pico voltamperométrico del proceso de adsorción puede, también, ser utilizado para calcular el recubrimiento

superficial, ya que es proporcional a la cantidad de carga consumida durante el proceso redox según la ecuación 1.36.

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma^*}{4RT} v \quad (1.35)$$

$$Q = nFA\Gamma^* \quad (1.36)$$

#### 1.4.1.2 Voltamperometría de pulso diferencial

La voltamperometría de pulso fue originalmente introducida para el electrodo goteante de mercurio (DME) (polarografía de pulsos) con el objetivo de aplicar un pulso por cada nueva gota de mercurio utilizada. Este electrodo dinámico, poco utilizado en la actualidad, generaba altas corrientes capacitivas. Las técnicas con aplicación de programas de potenciales más complejos que combinan barridos y saltos fueron desarrolladas con el objetivo de mejorar los límites de detección discriminando la contribución de la corriente capacitiva a la señal analítica. Esta discriminación se realiza al medir la corriente justo antes del final del pulso, donde la componente faradaica es significativamente mayor que la capacitiva. La razón de esta minimización es que la corriente faradaica usualmente decrece con  $t^{-1/2}$  mientras que la capacitiva lo hace de forma exponencial después de la aplicación del pulso ( $e^{-t}$ ). Como se comentó anteriormente, varios parámetros pueden influir en la corriente capacitiva: 1) el cambio del potencial aplicado ( $i_c = A C_{dl} v$ ), que en este caso, si el pulso dura un tiempo suficiente, el potencial durante el pulso se mantiene constante ( $v = 0$ ), 2) la corriente asociada a la imposición del pulso de potencial y la carga de la doble capa ( $i_c = ke^{\frac{-t}{R_s C_{dl}}}$ ) que decrece rápidamente con  $e^{-t}$ , 3) cambio en el área del electrodo, aspecto que no contribuye en electrodos sólidos. Según se elija un tiempo para tomar la medida mayor o menor desde la aplicación del pulso<sup>16</sup>, se puede obtener una mayor contribución a la corriente total de cada uno de los dos componentes.

En la técnica de pulso diferencial (DPV) se aplica un barrido de potenciales con la forma mostrada en la Figura 1.42. Básicamente consiste en una secuencia de pulsos de amplitud constante que se superpone a un incremento de potencial escalonado. La corriente es medida justo antes de la aplicación del pulso y al final del pulso, y la respuesta obtenida se representa por la diferencia entre ambas corrientes como función del potencial al pie

<sup>16</sup> Hay que considerar, que, generalmente, la medida de la corriente se hace en un período de tiempo que se integra para obtener un valor con menor influencia del ruido, por lo que estrictamente la corriente no se mide a un tiempo puntual del pulso.

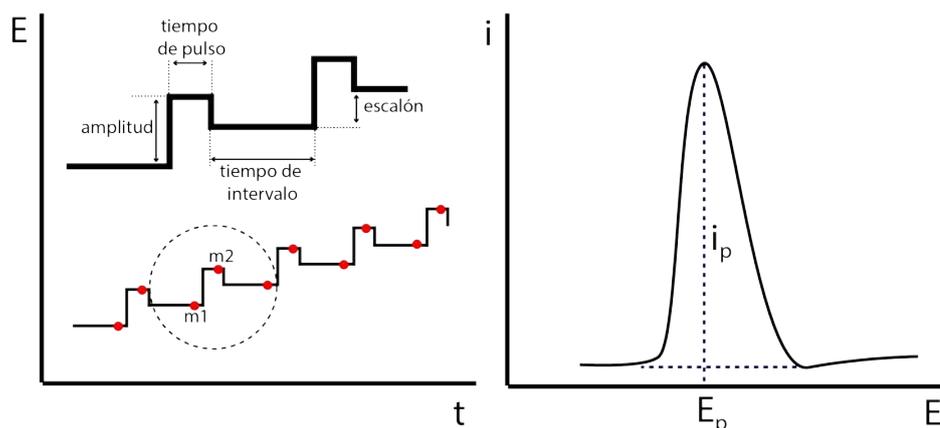


Figura 1.42: Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría de pulso diferencial.

del pulso, resultando en una respuesta voltamperométrica en forma de pico como se muestra en la figura mencionada<sup>17</sup>. Para un sistema reversible, la corriente de pico de un voltamperograma de pulso diferencial viene dada por la ecuación 1.37, donde  $\Delta E$  es la amplitud y  $t_p$  el tiempo del pulso. Debido a la doble medida, el potencial de pico,  $E_p$ , precede al potencial formal de la especie según la ecuación 1.38. La anchura de pico a la semialtura,  $w_{1/2}$ , para valores pequeños de  $\Delta E$  viene dada por la ecuación 1.39. La DPV aplica pulsos de amplitud pequeña, por lo que la contribución de la variación del potencial a la corriente capacitiva es baja.

$$\Delta i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \left( \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right); \sigma = \frac{nF\Delta E}{2RT} \quad (1.37)$$

$$E_p = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (1.38)$$

$$w_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad (1.39)$$

#### 1.4.1.3 Voltamperometría de onda cuadrada

En la voltamperometría de onda cuadrada, se aplica un barrido de pulsos con un potencial de base que varía de forma escalonada (Figura 1.43). En cada escalón de potencial ( $\Delta E_s$ ), un doble pulso simétrico es superpuesto. El primer pulso incrementa el potencial

<sup>17</sup> Esta diferencia de corrientes en algunos textos se representa como  $\Delta i_p$ , pero en esta Tesis Doctoral por simplificar se representará por  $i_p$ , y se llamará simplemente corriente de pico.

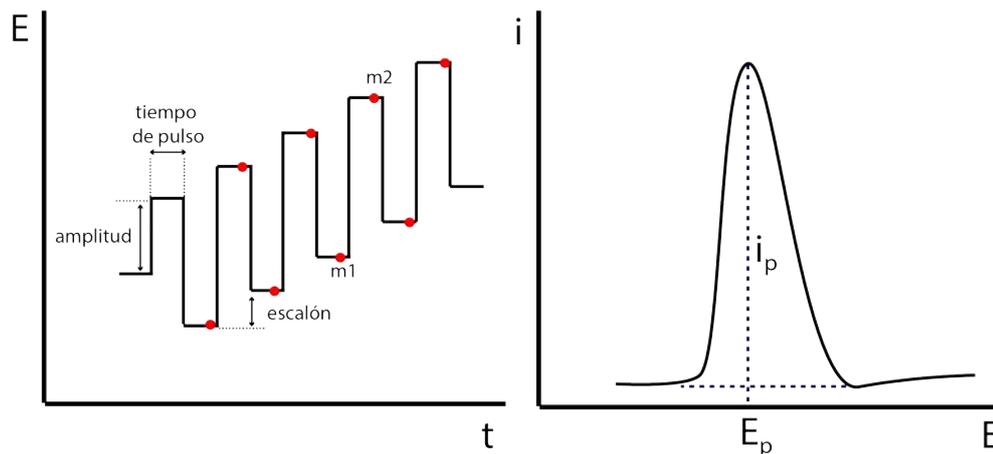


Figura 1.43: Magnitud de excitación y respuesta de la voltamperometría de onda cuadrada.

sobre el nivel del escalón, mientras que el segundo desplaza el potencial por debajo de este nivel. La corriente es detectada al final de cada pulso, y la respuesta obtenida es la diferencia de las corrientes entre cada pulso positivo ( $i_f$ ) y negativo ( $i_b$ ). Esta forma es realmente interesante para sistemas reversibles, donde se puede estar produciendo tanto la oxidación como reducción de la especie redox, por lo que la diferencia entre las corrientes se incrementa (como se puede ver en la [Figura 1.43](#)).

Los principales parámetros del pulso de onda cuadrada son el escalón de potencial ( $\Delta E_s$ ), la amplitud del pulso ( $\Delta E$ ), la velocidad de barrido del potencial ( $v = \frac{\Delta E_s}{t_p}$ ) y  $t_p$  es el tiempo del pulso, aunque generalmente se describe como la frecuencia del pulso ( $f = \frac{1}{t_p}$ ). La altura del pico voltamperométrico ( $i_p$ ) aumenta con la amplitud del pulso y con la frecuencia, pero a la misma vez la corriente capacitiva también se incrementa. Normalmente se obtiene un pico simétrico con  $E_p$  igual al  $E_{1/2}$ . El aumento de la amplitud del pulso por encima de  $50/n$  mV da lugar a un ensanchamiento del pico sin un aumento sustancial en la corriente, siendo ese valor el valor óptimo en términos de sensibilidad y resolución para un proceso reversible. Por otro lado, la  $i_p$  también depende de la frecuencia del pulso. La observación de las curvas para las medidas de los pulsos positivo y negativo puede indicar la reversibilidad de la reacción estudiada a simple vista (y la dependencia de sus potenciales de pico con la frecuencia). Una ventaja de la SWV en comparación a la DPV es que la velocidad de barrido puede ser mucho más rápida. Las características de la onda cuadrada hacen que la SWV sea la técnica voltamperométrica más sensible, especialmente si las corrientes capacitivas no son muy importantes (ya que

la SWV se ve más afectada por su contribución en comparación a la DPV, por la aplicación de una excitación de pulsos más agresivos con una mayor amplitud).

#### 1.4.1.4 Voltamperometría de redisolución anódica

Una de las técnicas más utilizadas durante esta Tesis Doctoral es la voltamperometría de redisolución anódica (ASV). Aunque, a modo de entender del autor, más que una técnica en sí, la ASV es un método que utiliza técnicas voltamperométricas. La ASV es especialmente utilizada en la determinación de metales y complejos metálicos, ya que permite su preconcentración en la superficie electródica y su posterior redisolución. Muy brevemente, la ASV consiste en las siguientes etapas ilustradas en la [Figura 1.44](#):

1. **Etapas de preconcentración:** durante esta etapa un potencial de reducción es aplicado con el objetivo de reducir las especies redox, y llevar a cabo su preconcentración en la superficie del electrodo. De esta manera, por la preconcentración, una gran cantidad de la especie (en términos comparativos con el seno de la disolución) está localizada sobre la superficie. En el caso específico de un metal, el ion metálico se reduce para generar el metal en estado de oxidación cero, típicamente sólido, que se adsorbe sobre la superficie electródica. Esta etapa también puede llamarse **etapas de deposición**<sup>18</sup>.
2. **Etapas de equilibrio:** en esta etapa, que típicamente consta de pocos segundos, se deja en reposo la disolución, ya que, típicamente, la etapa de preconcentración se realiza con agitación. Aunque trabajando con electrodos serigrafados de forma convencional no se suele agitar.
3. **Redisolución:** aplicación de un barrido de potenciales (cualquier técnica voltamperométrica puede ser utilizada) desde el potencial de reducción utilizado en la primera etapa hasta un potencial donde se produzca la reoxidación (y redisolución) del metal desde su estado de oxidación cero hasta un estado de oxidación mayor. En condiciones normales, la corriente generada es proporcional a la cantidad de especie preconcentrada en el electrodo y, a su vez, a la concentración de especie en la disolución. En ciertos casos muy específicos, se pueden obtener más de un pico de redisolución para un metal depositado, si la energía de enlace de los átomos es diferente. Pero típicamente, cuando se realiza la electrodeposición con fines analíti-

---

<sup>18</sup> A lo largo de esta Tesis Doctoral se utilizarán ambos términos indistintamente.

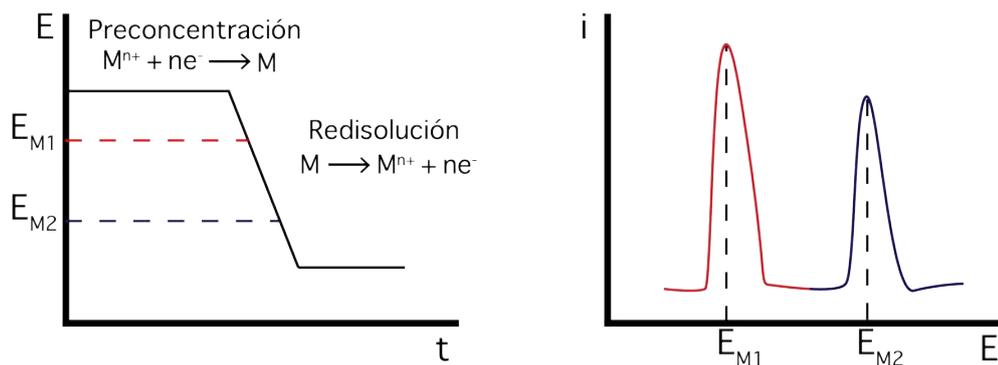


Figura 1.44: Perfil de potenciales de la preconcentración mediante deposición y respuesta voltamperométrica obtenida para una mezcla de dos especies.

cos (determinación de trazas), la diferencia en esta energía es mínima y solamente aparece un proceso de redisolución.

Por motivos obvios debidos a la preconcentración de la especie sobre el electrodo (básicamente se produce una adsorción del metal), la reoxidación está amplificada en relación a la reducción que estaría limitada por la difusión de la especie al electrodo. De esta manera, se obtiene una mejora en los límites de detección en comparación a la determinación directa de la especie (LOD de ppb o, incluso por debajo). Mientras su ventaja en la sensibilidad es evidente, como aspecto negativo se encuentra que la capacidad de preconcentración en el electrodo está limitada por diferentes factores (siendo el principal el área electródica), y por tanto, puede llegar a un punto donde no se pueda preconcentrar más especie por la saturación del electrodo. Este hecho hace que en concentraciones más elevadas, la relación entre la concentración de especie en disolución y la respuesta voltamperométrica no sea lineal. Históricamente, los electrodos de gota de mercurio o de película de mercurio fueron ampliamente utilizados para la determinación de metales, especialmente metales pesados, mediante ASV por sus excelentes características analíticas. Sin embargo, por la alta toxicidad de este metal y su difícil manejo, en los últimos años se han buscado alternativas para reemplazar el mercurio con otro tipo de electrodos.

#### 1.4.2 Cronotécnicas

Las cronotécnicas electroquímicas comprenden la cronoamperometría, cronopotenciometría y cronocoulombimetría. Estas técnicas miden la respuesta obtenida en función del tiempo de un sistema electroquímico al que se aplica una magnitud de excitación. Espe-

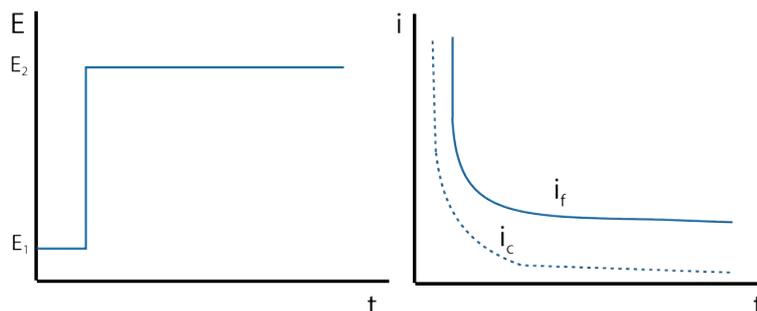


Figura 1.45: Magnitud de excitación y respuesta de la cronoamperometría.

cíficamente, en la cronoamperometría se aplica un potencial (o salto de potenciales) y se mide la variación de corriente a lo largo del tiempo, en la cronopotenciometría se aplica una corriente (o salto de corrientes) y se observa la variación del potencial con el tiempo, y en la cronocoulombimetría se aplica un potencial (o salto de potenciales) y se observa la generación/consumo de carga por el sistema. En algunos de los trabajos de esta Tesis Doctoral se aplica la cronoamperometría por lo que se describen brevemente sus fundamentos teóricos más destacables a continuación.

#### 1.4.2.1 Cronoamperometría

En la cronoamperometría se puede aplicar un potencial constante durante toda la medida (se aplica un salto desde un potencial en el que no se está produciendo ninguna reacción y donde no fluye corriente faradaica hasta el potencial determinado) o se pueden aplicar diferentes potenciales durante diferentes tiempos a lo largo de toda la medida en el caso de querer realizar experimentos más complejos. Como se observa en la [Figura 1.45](#), el potencial de excitación produce un salto desde  $E_1$  hasta  $E_2$ , donde se mantendrá constante durante el tiempo especificado por el usuario. Al aplicar este potencial se puede estar produciendo una transferencia electrónica entre el electrodo y una especie redox, y la corriente generada (o consumida) es proporcional a la cantidad de especie que reacciona según la ley de Faraday. Si el sistema está limitado por difusión se comporta según el modelo de Cottrell (ecuación [1.40](#)).

$$i = \frac{nFAD^{1/2}C}{(\pi t)^{1/2}} \quad (1.40)$$

Esta respuesta cronoamperométrica típica se puede observar en la [Figura 1.45](#), donde la corriente disminuye con el tiempo por el límite de la difusión de la especie que reacciona

hacia el electrodo. En la figura también se puede observar como varía tanto la corriente faradaica como la corriente capacitiva con el tiempo desde la aplicación del salto de potencial. La corriente faradaica sigue la ecuación de Cottrell, donde la magnitud de corriente disminuye con la raíz cuadrada del tiempo, mientras que la corriente capacitiva disminuye de manera exponencial con el tiempo. Esto implica que la contribución capacitiva se minimiza con el paso del tiempo, pero está muy influenciada a tiempos cortos. Debido a la variación de la corriente con el tiempo, aunque la corriente tiende a cero, su variación a tiempos relativamente altos es muy pequeña, obteniendo corrientes prácticamente constantes a partir de un tiempo determinado, llamada la corriente de estado quasi-estacionario ( $i_{qss}$ ). Otro aspecto a destacar es que en experimentos de largos tiempos, pueden aparecer procesos de convección natural en la disolución que mantienen la transferencia de masa hacia el electrodo, algo que también ayuda a obtener una corriente de este tipo.

Una forma de evaluar si el experimento cronoamperométrico sigue la ecuación de Cottrell, que es válida para una reacción limitante por la difusión, es la representación de la corriente frente a  $t^{1/2}$ . Como el resto de parámetros de la ecuación son constantes en la escala de tiempo del experimento, esta representación debería ser una línea recta. Una desviación de este caso, podría indicar complicaciones cinéticas de la reacción electroquímica (reacción lenta) o reacciones acopladas. Un caso especial son las curvas  $i-t$  obtenidas para estudios de electrodeposición, ya que se producen diferentes procesos de nucleación y crecimiento que influyen en la respuesta cronoamperométrica, obteniendo curvas características como se describe en el [Capítulo 2](#). La alta resolución temporal de la cronoamperometría pudiendo medir la variación de respuesta en períodos de tiempo menores a ms, es muy adecuado para el estudio de este tipo de procesos.

#### 1.4.3 *Espectroscopia de impedancia electroquímica*

Otra técnica utilizada en algunos experimentos realizados durante esta Tesis Doctoral es la Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Las bases fundamentales de esta técnica son ciertamente complejas, y no tienen cabida en este texto, pero se va a intentar explicar, de manera sencilla (y a veces, simplificando), los conceptos básicos y sus posibilidades. Las técnicas explicadas hasta ahora, se llevan a cabo tras aplicar grandes cambios en la magnitud de excitación (típicamente saltos o barridos de potenciales de varios cientos de mV). Considerando específicamente una voltamperometría lineal, la respues-

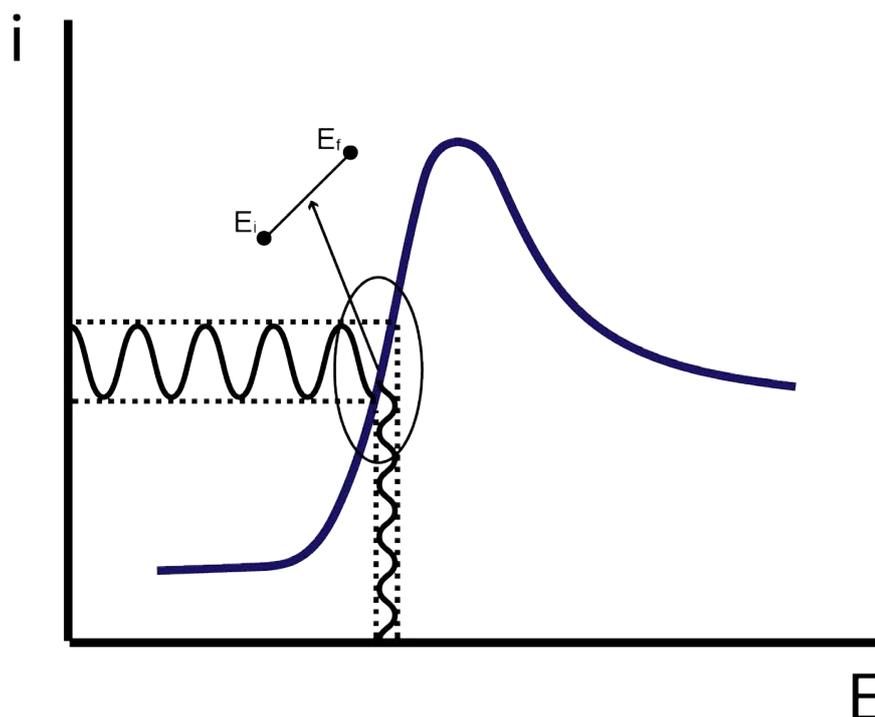


Figura 1.46: Extracción de una respuesta lineal en una curva voltamperométrica no lineal.

ta obtenida (curva  $i$ - $E$ ) no es lineal, ya que estas curvas pueden tener diferentes formas, con aumentos y disminuciones de la corriente, procesos en forma de pico o con mesetas, según se produzcan los procesos redox determinados por las especies en disolución y el cambio de potencial aplicado. Sin embargo, si se observa detenidamente la curva  $i$ - $E$ , existen zonas donde la respuesta es lineal al considerar un rango de valores de excitación muy pequeños. Por tanto, una alternativa a los métodos típicos, son las técnicas en las que la excitación se aplica con una amplitud pequeña donde los saltos o barridos son lo suficientemente pequeños para generar una respuesta lineal (Figura 1.46).

La espectroscopía de impedancia electroquímica es una técnica que emplea una magnitud de excitación de pequeña amplitud (excitación de corriente alterna) para obtener una respuesta lineal. Generalmente, un experimento de EIS se compone de la aplicación de la excitación obteniendo una respuesta eléctrica a diferentes frecuencias de excitación. La excitación varía en forma de onda en relación al tiempo (normalmente, de forma sinusoidal), y por tanto, se pueden obtener diferentes respuestas aplicando ondas de diferentes frecuencias. Con los resultados obtenidos, se diseña un circuito equivalente del sistema objeto de estudio, con diferentes elementos que puedan contribuir a la impedancia y que

equivalen a características físico-químicas del sistema electroquímico estudiado. El circuito diseñado se ajusta matemáticamente a los resultados experimentales y se evalúan los diferentes elementos del sistema por separado.

La impedancia es la oposición de un circuito eléctrico al paso de corriente alterna cuando un potencial alterno es aplicado. El flujo de corriente continua a través de un conductor viene dado por la ley de Ohm ( $E = iR$ ). Cuando se considera una corriente alterna, la impedancia reemplaza a la resistencia, ya que en estas condiciones algunos elementos eléctricos (condensadores y bobinas, principalmente) causan un desfase de la onda entre el potencial y la corriente que debe tenerse en cuenta. En EIS faradaica, la más utilizada, un par redox, en concentración similar, es alternativamente oxidado y reducido por la transferencia electrónica a y desde el electrodo. De esta forma, se trabaja en unas condiciones muy cercanas al equilibrio (pero fuera del equilibrio), en las que ninguna de las especies se agota en la superficie electrodo. Las especies más convenientes para ello son el  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  y el  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , ya que son especies bien comportadas electroquímicamente (transferencia electrónica de esfera externa y rápidas). Antes de realizar un experimento EIS se suele estimar el potencial de equilibrio en las mismas condiciones (o de manera aproximada el potencial de semionda mediante CV). Las diferentes etapas de una reacción electroquímica (explicadas anteriormente) pueden influir en la respuesta impedimétrica, que puede proporcionar información sobre las características de cada una de ellas, como por ejemplo, de la velocidad de transferencia electrónica, las características de la doble capa eléctrica o de la transferencia de masa.

Una onda sinusoidal de AC (ver [Figura 1.47](#)), como las consideradas en EIS, se caracteriza por su amplitud ( $E_m$  o  $I_m$ ), frecuencia ( $f$ , a veces indicado por la velocidad angular,  $\omega = 2\pi f$ ) y el ángulo de fase  $\varphi$  con respecto a la señal de referencia (por convención el ángulo de fase del potencial AC es cero, y el ángulo de fase se define desde esta señal de referencia). El potencial aplicado en un experimento EIS resulta de una superposición de un potencial de corriente continua ( $E_{\text{DC}}$ ) y un potencial de corriente alterna ( $E_{\text{AC}}$ ) según:  $E = E_{\text{DC}} + E_{\text{AC}} = E_{\text{DC}} + E_m (\sin \omega t)$ . De la misma manera, la respuesta de corriente consiste de una componente continua y una alterna ( $i = i_{\text{DC}} + i_{\text{AC}} = i_{\text{DC}} + i_m (\sin \omega t + \varphi)$ ). La  $I_{\text{AC}}$  está desplazada en un ángulo de fase,  $\varphi$ , desde el  $E_{\text{AC}}$  aplicado, ya que los diferentes componentes del circuito pueden causar un desplazamiento en la fase. Para facilitar la interpretación de estas magnitudes alternas, se suelen escribir como números complejos ya sea en coordenadas polares o cartesianas ( $E_{\text{AC}} = E_m \exp(j\omega t)$  y  $I_{\text{AC}} = I_m \exp(j\omega t + \varphi)$ ). La impedancia electroquímica de la celda viene dada, de manera análoga a la ley de Ohm

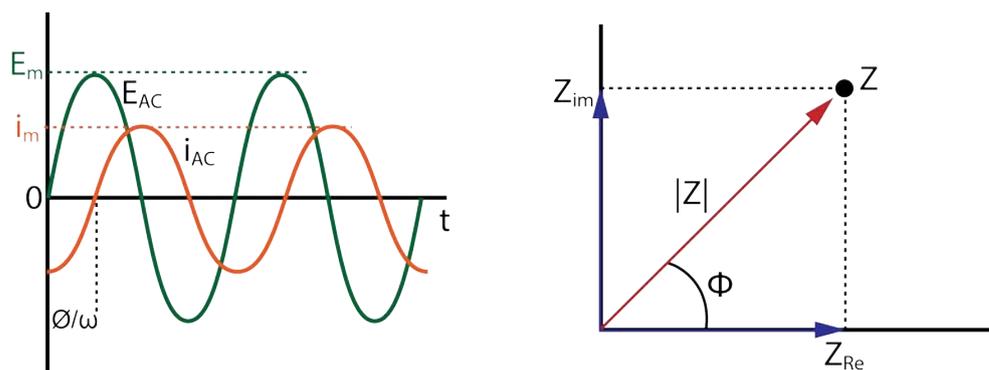


Figura 1.47: A) Evolución temporal del potencial y corriente alternos desfasados. B) Representación vectorial (del fasor) de la impedancia.

por la ecuación  $Z = E_{AC}/i_{AC} = |Z| \exp(j\phi)$ , donde  $|Z| = E_m/i_m$ . Esta ecuación muestra como la impedancia está definida por dos parámetros: su módulo y el ángulo de fase. Una representación gráfica de la impedancia puede obtenerse a partir de la ecuación  $Z = |Z|(\cos\phi + j\sin\phi) = Z_{re} + Z_{im}$ . De acuerdo a esta relación, la impedancia es un número complejo con los números reales  $Z_{re}$  y  $Z_{im}$  representando la proyección del módulo de impedancia en los ejes de un sistema de coordenadas cartesiano. La impedancia se puede representar en un plano complejo por un vector (llamado fasor) como se muestra en la Figura 1.47. Esta representación con los datos obtenidos a diferentes frecuencias de la magnitud de excitación aplicada (y representada con  $Z_{Re}$  en el eje de abscisas y con  $-Z_{im}$  en el eje de ordenadas) es la llamada gráfica de Nyquist, cuya representación más típica, se muestra en la Figura 1.48.

La etapa más crítica en un experimento de EIS es la evaluación de la respuesta obtenida y su ajuste a un circuito eléctrico equivalente de la celda electroquímica estudiada. Los elementos más básicos que se pueden encontrar en una celda electroquímica típica (con difusión, transferencia electrónica faradaica y doble capa eléctrica) son los siguientes:

- **Resistencia de la disolución o resistencia óhmica ( $R_s$ ):** resistencia al flujo de corriente en la disolución (migración iónica) que viene determinada por la conductividad de la disolución (tipo y concentración del electrolito de fondo) y la geometría de la celda (distancia entre electrodos). Este parámetro sigue la ley de Ohm ( $E_{AC} = i_{AC} R_s$ ) y no causa un cambio de fase de la corriente. Con un electrolito de fondo adecuado, esta componente no tiene una influencia determinante en la impedancia total.
- **Resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ):** refleja la cinética de la transferencia electrónica entre la especie redox y el electrodo. Típicamente, la  $R_{ct}$  es máxima al

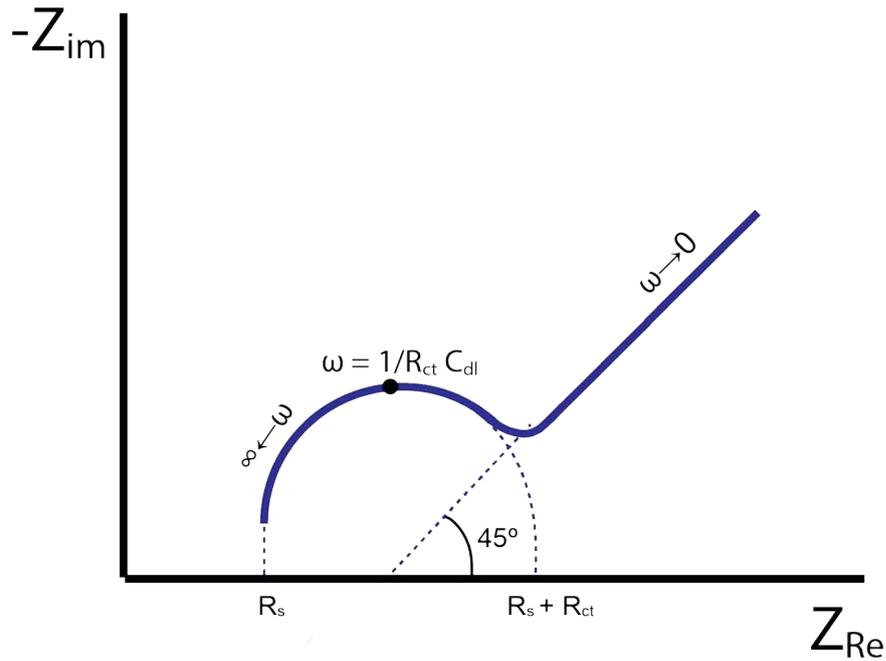


Figura 1.48: Representación de Nyquist de la respuesta impedimétrica.

potencial de equilibrio del sistema redox utilizado, por lo que se suele perturbar el sistema alrededor de este máximo. A este potencial la respuesta es lineal y  $R_{ct}$  es inversamente proporcional a la corriente de intercambio ( $i_0$ ) según la ecuación 1.41. La corriente de intercambio como se describió depende de  $k_0$  (constante de velocidad de la reacción). Como este valor depende fuertemente de las características del electrodo de trabajo, la EIS es una técnica muy empleada para la caracterización de superficies electrónicas modificadas con diferentes materiales.

- **Capacitancia de la doble capa ( $C_{dl}$ ):** refleja los procesos de reordenamiento iónico (flujo de corriente iónica) en la interfase electrodo/disolución con objetivo de minimizar el cambio del potencial eléctrico aplicado. Este valor depende del área electrónica, la naturaleza y fuerza iónica del electrolito de fondo y de la constante dieléctrica.
- **Impedancia de Warburg ( $Z_W$ ):** muestra el efecto del transporte de masa (difusión) desde el seno de la disolución hasta la superficie electrónica, ya que el sistema también presenta una resistencia a este movimiento. Depende del coeficiente de difusión de la especie redox.

$$R_{ct} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (1.41)$$

Normalmente utilizando la representación de Nyquist, los resultados experimentales obtenidos, se deben ajustar matemáticamente a un circuito equivalente<sup>19</sup>, cuyo exponente más sencillo es el circuito de Randles, que se muestra en la Figura 1.49 y que se ajusta a los datos experimentales mostrados en la Figura 1.48. Visualmente, puede obtenerse cierta información como la  $R_s$  que sería la intersección de la curva con el eje de  $Z_{Re}$  a frecuencias altas (parte izquierda de la figura), el diámetro del semicírculo proporciona el valor de  $R_{ct}$ , y la  $C_{dl}$  podría obtenerse de la frecuencia en el máximo valor del semicírculo (conociendo la frecuencia y la  $R_{ct}$ ). Es importante describir las razones por las que los diferentes elementos se encuentran en esta configuración, ya que es algo que no se encuentra en muchos textos introductorios. La transferencia electrónica y la difusión son procesos físicos consecutivos por lo que la  $R_{ct}$  y la  $Z_w$  se encuentran colocados en serie en el circuito. La corriente aplicada al sistema puede tomar dos caminos: producir la transferencia electrónica o cargar la doble capa eléctrica, por lo que la  $R_{ct}$  y la  $C_{dl}$  se colocan en paralelo en el circuito equivalente (ya que compiten entre sí). La resistencia de la disolución es una resistencia que influye en todo tipo de corrientes en la disolución, por lo que la  $R_s$  estará en serie con el resto de parámetros.

En sistemas más complejos, por ejemplo, electrodos porosos, sistemas redox donde la adsorción tenga un papel fundamental, o electrodos donde se produce una corrosión, diferentes circuitos equivalentes tienen que ser diseñados para ajustar los resultados experimentales obtenidos. Por otro lado, suele ser típicos los sistemas donde la impedancia se desvía de un comportamiento puramente capacitivo, y se debe modelar con un elemento de fase constante (CPE). Sin embargo, por la mayor complejidad de este sistema, no se va a tratar aquí. Otro tipo de representación alternativa son las gráficas de Bode que consisten en representar el  $\log |Z|$  o el ángulo de fase frente al logaritmo de la frecuencia. De esta forma se puede obtener información sobre el cambio de fase que proporcionan los diferentes elementos del sistema.

#### *EIS faradaica vs. no faradaica*

Aunque la técnica se ha descrito para referirse a un sistema redox que intercambia electrones con el electrodo, la EIS también puede utilizarse en un sistema sin intercambio electrónico entre el electrodo y una especie redox (sin producir una reacción electroquí-

<sup>19</sup> Hay que destacar que pueden existir varios circuitos equivalentes que se ajusten a los mismos datos experimentales. En ese caso, el usuario debe tener un sentido crítico para estimar los procesos físicos que ocurren en el sistema. La interpretación de espectros de impedancia es, en ciertas ocasiones, más un arte que una ciencia.

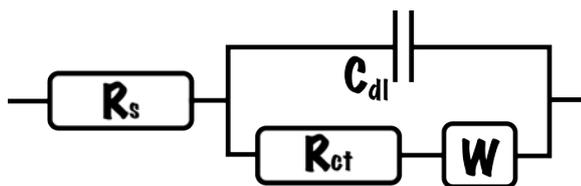


Figura 1.49: Circuito equivalente Randles para un sistema faradaico típico.

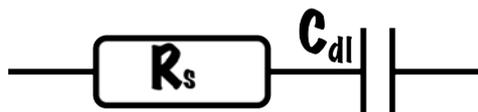


Figura 1.50: Circuito equivalente para un sistema no faradaico.

mica). En este tipo de sistemas, pueden existir procesos no faradaicos, como la carga de la doble capa eléctrica por el reordenamiento iónico tras la aplicación del potencial sinusoidal. Esta técnica es la que se utiliza, generalmente, en los biosensores capacitivos, ya que ofrece información de los componentes resistivos (de la disolución) y capacitivos (de la doble capa eléctrica) y el modelo puede ajustarse, normalmente, al circuito equivalente de la [Figura 1.50](#). Como la resistencia óhmica (de la disolución) es independiente de la frecuencia de la onda aplicada, su módulo de impedancia es igual a la resistencia en sí misma y el ángulo de fase es cero, y por esta razón, este tipo de impedancia se presenta en la gráfica de Nyquist en el eje horizontal.

#### 1.4.4 Microscopía de barrido electroquímico

La microscopía de barrido electroquímico (SECM) es una técnica encuadrada dentro de la microscopía de sonda de barrido (SPM) y que fue introducida en 1989 por Bard et al.<sup>196</sup>. Básicamente consiste en el barrido de una superficie (del sustrato investigado) utilizando un ultramicroelectrodo (UME) como sonda, y en el que todo el sistema se introduce dentro una disolución que contiene al menos un electrolito de fondo y, generalmente, una especie redox indicadora. El sistema se compone, además, de un electrodo de referencia y auxiliar y de un sistema piezoeléctrico que se encarga de posicionar la sonda en diferentes zonas de la superficie del sustrato (a parte del sistema potencioestático y de tratamiento de datos). El esquema general de la instrumentación de SECM se representa en la [Figura 1.51](#). Gracias al eficaz posicionamiento por el sistema piezoeléctrico y al pequeño tamaño del UME utilizado, se pueden obtener medidas electroquímicas localizadas a lo largo de la

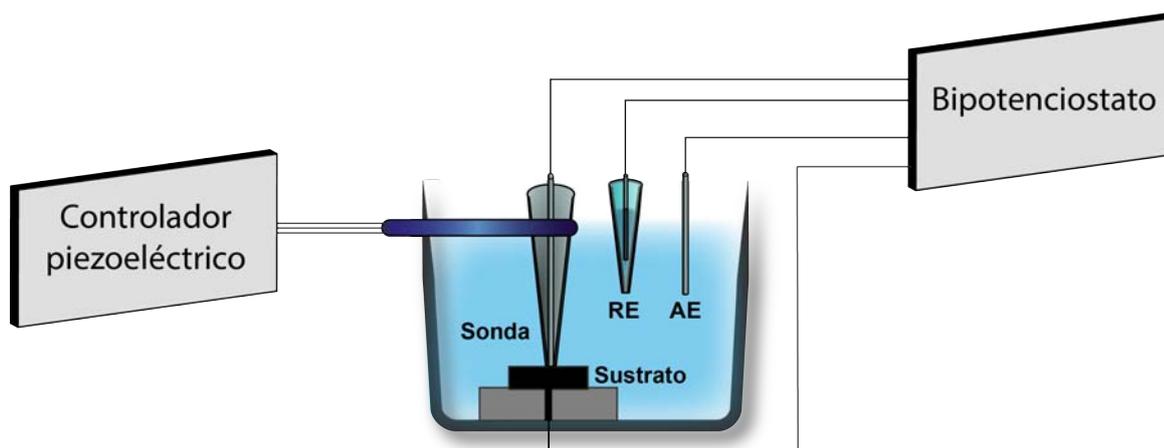


Figura 1.51: Esquema de la microscopía electroquímica de barrido.

superficie escaneada. La resolución vendrá dada por el tamaño y forma de la sonda y por la separación entre la sonda y el sustrato, y puede llegar a ser nanométrica. Existen diferentes modos de obtener información electroquímica de los sustratos utilizando SECM, que pueden ser estudiados en textos de referencia de esta técnica<sup>197</sup>.

En SECM se utilizan las curvas de acercamiento (*approach curves*) para poder conocer la distancia a la que se encuentra la punta del UME de la superficie del sustrato. En estas curvas, normalmente, se observa un cambio de la corriente medida en función de la distancia al sustrato. En este sentido, varias estrategias se pueden utilizar en SECM para posicionar la sonda en la superficie del sustrato: el modo de altura constante (el más utilizado), el modo de distancia constante y el modo de corriente constante. En el modo de altura constante, el sustrato se barre con el UME en una posición a una altura constante de la superficie. Su principal problema es que según varíe la topografía de la superficie, la distancia entre el UME y la superficie puede variar, incluso haciendo que la sonda pierda el contacto con la superficie o se produzca su rotura (por chocar con una estructura más elevada). En el modo de distancia constante, que sería más adecuado, la posición de la sonda puede variar según la topografía de la superficie manteniendo una distancia entre la sonda y la superficie constante. Sin embargo, una forma para separar la actividad electroquímica de la topografía sería necesaria ya que la corriente medida está influenciada tanto por la separación como por la naturaleza del sustrato escaneado (que suele ser bastante variable). El último modo posible de operación sería el de corriente constante, en el que se obtendría una distancia constante si la actividad del sustrato es homogénea a lo largo de la superficie, pero se encontrarían complicaciones cuando esta actividad es heterogé-

nea (como en la mayoría de los casos). Por tanto, estas técnicas, aunque muy interesantes, pueden ser mejoradas con un mecanismo de información sobre la topografía que no esté afectado por la actividad del sustrato. Algunas alternativas para poder conseguir una forma óptima de escaneado han sido evaluadas como por ejemplo en *contacto intermitente* (IC-SECM), donde la sonda se oscila en el eje z (mediante un generador de CA), y la oscilación disminuye cuando la sonda se encuentra en contacto con la superficie<sup>198,199</sup>.

En los últimos años se han desarrollado variaciones de la SECM con el objetivo de mejorar este aspecto, en las que en lugar de utilizar un UME, se utiliza un capilar abierto que contiene una disolución en su interior. Este hecho mejora los posibles problemas que surgen cuando el UME se posiciona en una superficie que no es totalmente plana y su colocación no es totalmente eficaz (ver [Figura 1.52](#)). Una de estas técnicas es la microscopía de conductancia iónica de barrido (SICM)<sup>200</sup>. En esta técnica, un electrodo de quasireferencia de Ag/AgCl que funciona como auxiliar y quasireferencia (QRCE) se coloca dentro del capilar relleno de la disolución de electrolito, y otro electrodo similar se coloca dentro de la disolución de la celda. Una corriente iónica fluye entre los dos QRCEs tras aplicar una diferencia de potencial entre ellos. Además, la sonda es igualmente oscilada en la dirección z, que genera una componente AC en la corriente iónica, cuyo magnitud es más sensible a la distancia entre la sonda y el sustrato. Otra variación es la *Scanning micropipette contact method* (SMCM)<sup>201</sup>, que utiliza una sonda con un tip de micropipeta que se llena de una disolución con electrolito y una especie indicadora redox. Un QRCE se coloca dentro del tip de micropipeta y el sustrato funciona como electrodo de trabajo, en una disposición de dos electrodos. El tip de la micropipeta permite que la disolución esté formando una pequeña gota en su extremo, que se posiciona cerca del sustrato y la cantidad de superficie de la celda electroquímica está determinada por el contacto de la microgota con el sustrato.

#### 1.4.4.1 Microscopía de celda electroquímica de barrido (SECCM)

La microscopía de celda electroquímica de barrido (SECCM, *scanning electrochemical cell microscopy*) descrita en 2010 por Unwin et al.<sup>202,203</sup> utiliza un capilar de dos canales como sonda. Dos QRCEs se introducen en cada uno de los canales y el capilar se rellena del electrolito de fondo y una especie indicadora redox. En el extremo de la sonda se genera una pequeña gota (llamado menisco) de la disolución del capilar que conecta ambos canales, cerrando el circuito entre los electrodos. Un esquema de un sistema SECCM se muestra en la [Figura 1.53](#). Al aplicar una diferencia de potencial entre los dos QRCEs, una corriente

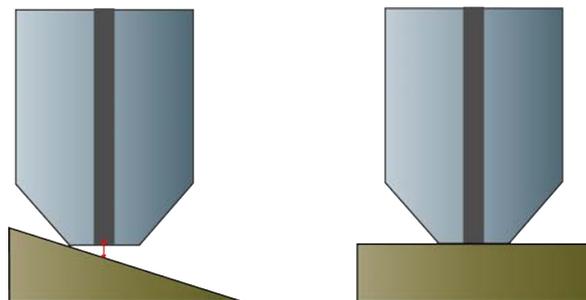


Figura 1.52: Contacto no efectivo del UME de la SECM en una superficie no plana.

iónica es generada entre los dos canales. Además, el capilar es oscilado en la dirección  $Z$ , que genera una componente de corriente alterna a la corriente iónica. Esta corriente alterna es mínima cuando la sonda no está en contacto con el sustrato, pero aumenta bruscamente cuando la gota del extremo del capilar contacta con la superficie del sustrato, por un cambio en la resistencia de la disolución del menisco debido a la deformación reversible de la gota al oscilar mientras se encuentra en contacto con la superficie. De esta forma, se puede obtener una magnitud muy sensible para mantener un contacto constante y eficiente de la sonda con la superficie del sustrato, minimizando los problemas que se describieron en el caso de SECM. Este contacto tan eficiente permite la obtención de imágenes topográficas con alta resolución. La corriente iónica generada entre los dos canales es sensible a la naturaleza local de la interfase del sustrato, proporcionando información sobre la mojabilidad de la superficie o la dirección del flujo iónico generado (que también depende de las condiciones de la superficie). Por otro lado, el sustrato está conectado al circuito y funciona como electrodo de trabajo (se aplica una diferencia de potencial entre uno de los QRCEs y este sustrato). La corriente medida en el sustrato proporciona información sobre su actividad electroquímica localizada solamente en la zona dónde la sonda hace contacto. Por todas estas características, SECCM puede ser utilizada para obtener gran cantidad de información (física, química y electroquímica) de manera simultánea del sustrato estudiado que puede ser conductor o semiconductor (o incluso aislante, aunque en este caso no se obtendría información electroquímica). La utilización de la sonda con un sistema piezoeléctrico permite escanear una superficie y obtener toda esa información en diferentes zonas del sustrato. Más información sobre la instrumentación específica y el

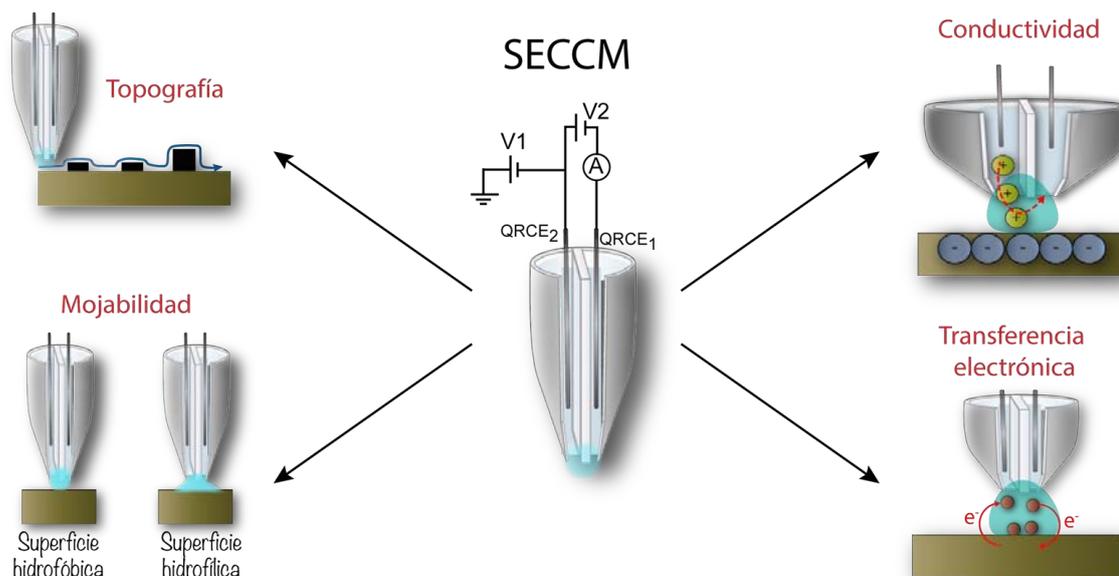


Figura 1.53: Esquema de una sonda de SECCM y la diferente información que puede proporcionar de un sustrato.

modo de operación específico de SECCM utilizado en esta Tesis Doctoral se describe en el [Capítulo 2](#).

A parte de todas las interesantes propiedades mencionadas de la SECCM, esta técnica tiene varias de las ventajas de las técnicas anteriormente descritas:

- La magnitud utilizada para posicionar la sonda en la superficie (componente alterna de la corriente iónica) no está afectada por la actividad del sustrato, solamente por su topografía. Este hecho permite separar la magnitud utilizada para detectar el contacto con la superficie de la reactividad electroquímica del sustrato. La posición de la sonda en la superficie (en el eje de las  $z$ ) es muy sensible y configurable, pudiendo ajustar instrumentalmente la corriente umbral en la que el instrumento considera el contacto con la superficie (y por tanto, ajustar la distancia de la sonda con la superficie).
- El contacto con el sustrato solamente se realiza mediante el menisco que se encuentra en el extremo del capilar. Este hecho permite llevar a cabo el barrido en zonas de la superficie nuevas en las mismas condiciones que la medida inicial. En el caso de las técnicas dónde el sustrato se coloca dentro de una disolución, es posible que con el tiempo (como se está aplicando una excitación), la superficie pudiera variar en función del tiempo, y en consecuencia, las medidas a mayor tiempo podrían no

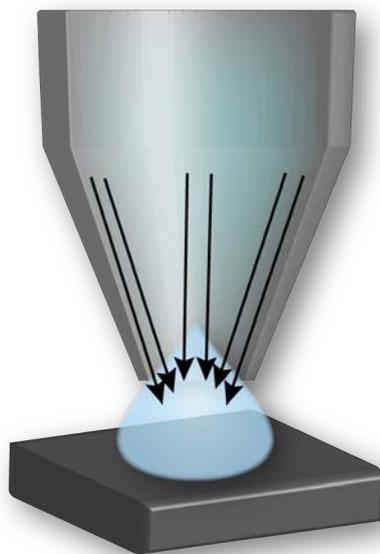


Figura 1.54: Esquema de la sonda de SECCM que indica la difusión radial hacia el sustrato.

ser totalmente equivalentes a las iniciales. Esto tiene mucha importancia ya que, normalmente, los estudios con SECM conllevan un tiempo considerable.

- El contacto del menisco con la superficie deja un pequeño residuo salino (del electrolito de fondo) en la superficie del sustrato. Este residuo puede ser observado con diferentes técnicas de caracterización microscópica para correlacionar la estructura del sustrato con la actividad electroquímica.
- Debido a la geometría del extremo de la sonda (ver [Figura 1.54](#)), el perfil de difusión de la especie indicadora hacia el sustrato sigue un perfil radial. Esto genera una velocidad de transferencia de masa elevada que dan lugar a corrientes de estado estacionario en unas condiciones adecuadas de medida. El flujo constante de especie a la interfase electrodo/disolución, facilita el estudio de la cinética de reacciones electroquímicas, incluso para reacciones relativamente rápidas. Se ha comprobado que en una configuración SECCM, la corriente límite obtenida es el 40% de la corriente límite típica en un microelectrodo ( $i_{lim} = 0,4\pi nFDCr$ ).
- La utilización de capilares con extremos abiertos permite obtener sondas con diámetros muy pequeños de manera muy simple. En el caso de SECM, al ser necesario un ultramicroelectrodo (normalmente un hilo metálico), el tamaño de este material va

a limitar el tamaño de la sonda. Aunque existe una tendencia a utilizar nanoelectrodos, su fabricación es más compleja. Esta característica permite obtener una mayor resolución espacial, de manera general, que con la SECM.

Por estas características, la SECCM ha mostrado una excelente capacidad de obtener información electroquímica de diversos sustratos. Por ejemplo, ha permitido el estudio localizado de la actividad electroquímica de electrodos de carbono, como el HOPG. Un debate científico sobre la reactividad de los planos basales frente a los defectos superficiales ha sido constante en los últimos años<sup>204</sup>. La SECCM ha permitido observar con alta resolución espacial que la velocidad de transferencia electrónica en el plano basal de los materiales de grafito es similar a los defectos superficiales<sup>205</sup>, para diferentes reacciones electroquímicas de esfera externa<sup>206</sup> o interna<sup>207</sup>. Un tema de mucho interés es la detección de nanopartículas para estudiar sus propiedades de forma individual. SECCM se ha utilizado para hacer un mapa de la reactividad de NPs individuales capaces de mostrar la diferente actividad catalítica con pequeños cambios morfológicos<sup>208</sup>, o en experimentos de impacto de NPs<sup>209,210</sup>. En este sentido, el estudio con SECCM de la electrodeposición de AgNPs sobre sustratos de HOPG ha proporcionado información muy interesante sobre el mecanismo de electrodeposición de nanopartículas metálicas<sup>98</sup>. Por otro lado, SECCM ha permitido estudiar la variación de la respuesta electroquímica en diferentes cristales de electrodos de Pt policristalinos<sup>211</sup>. Por la utilidad de los nanomateriales de carbono, su caracterización a nivel estructural es realmente importante para conocer y explicar sus excelentes propiedades. Con la alta resolución que proporciona la SECCM, se ha podido obtener información electroquímica en la nanoescala de nanomateriales tan importantes como nanotubos de carbono dispuestos en un red bidimensional<sup>212</sup> o incluso de manera individual<sup>213,214</sup>, y también de grafeno<sup>86,87</sup>.

## 1.5 OBJETIVOS

El presente trabajo surge de la necesidad de desarrollar nuevas marcas de detección de biosensores electroquímicos usando nanopartículas con el fin de comparar su comportamiento con otras marcas utilizadas en el grupo de investigación, como enzimáticas o electroactivas directas. Aunque los quantum dots ya se habían utilizado para detección electroquímica de bioensayos, hasta la fecha no habían sido descritos en un sistema biosensor (bioensayo y transducción integrada), por lo que también se propuso inicialmente cubrir ese hueco. Por tanto, el desarrollo de biosensores electroquímicos con quantum dots como marca en un sistema integrado basado en electrodos serigrafados fue el comienzo de esta Tesis Doctoral. Otro de los objetivos de la Tesis Doctoral era la optimización y utilización de nanopartículas de fosfato de titanio como marca electroquímica de biosensores desechables. En ambos casos, el planteamiento fue el desarrollo de una metodología de detección utilizando un sistema de reconocimiento de alta afinidad, como es la interacción biotina-(estrep)avidina, y, a continuación, evaluar su comportamiento en un sistema más complejo como es el desarrollo de un inmunosensor para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. Como el objetivo era la evaluación de las marcas nanoestructuradas, no se utilizan muestras reales en estos trabajos (aunque para la enfermedad celíaca se usan controles de suero similares a una muestra real). Aunque el objetivo principal era el desarrollo de marcas de biosensores, a lo largo del trabajo se investigaron las diferentes cualidades de estas nanopartículas para otro tipo de aplicaciones electroanalíticas, generando nuevos objetivos. Además, por la utilización de electrodos serigrafados como herramienta básica, se decidió llevar a cabo un estudio más fundamental sobre el comportamiento electroquímico de estos electrodos durante una estancia en el grupo "*Warwick Electrochemistry and Interfaces Group*" de la Universidad de Warwick, dirigido por el Prof. Patrick R. Unwin. De manera resumida, los objetivos principales de las tres partes de esta Tesis Doctoral se indican a continuación:

- El objetivo de la primera parte de esta Tesis Doctoral (capítulo 3) es conocer en mayor medida el comportamiento de la superficie electródica de los electrodos serigrafados de carbono, ya que estas herramientas presentan una superficie muy heterogénea y hasta la fecha no ha sido descrito ningún estudio electroquímico microscópico de estos electrodos tan usados.

- El objetivo de la segunda parte (capítulos 4, 5, 6 y 7) es la evaluación de los quantum dots como marca electroquímica de biosensores desechables integrando la etapa de reconocimiento (bioensayo) y de detección en la misma plataforma transductora (electrodos serigrafiados). En el capítulo 4, se busca desarrollar un método electroquímico sencillo, rápido y de bajo coste para la caracterización de tamaños de quantum dots de cadmio. Un objetivo parcial es el desarrollo de métodos electroquímicos con las mismas características para la determinación de la concentración de quantum dots de cadmio, tanto en un medio orgánico como acuoso. En los capítulos 5 y 6, se optimiza un método para la utilización de quantum dots como marca, y se evalúa su funcionamiento en biosensores electroquímicos (de afinidad e inmunosensores). El objetivo del capítulo 7 es el estudio electroquímico y microscópico de la electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots y la búsqueda de aplicaciones electroanalíticas.
- El objetivo de la tercera parte (capítulos 8, 9 y 10) es la optimización de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con diferentes metales electroactivos y biomoléculas, su evaluación y caracterización electroquímica (capítulo 8), desarrollo de biosensores electroquímicos desechables usando estas nanopartículas como marca (capítulo 9) y evaluar la capacidad que tienen de catalizar ciertas reacciones electroquímicas (capítulo 10).

Los objetivos específicos y el planteamiento para resolverlos vienen descritos con mayor detalle en cada capítulo.

## EXPERIMENTAL

---

### 2.1 INSTRUMENTACIÓN

#### 2.1.1 Aparatos

##### POTENCIOSTATOS

Las medidas electroquímicas realizadas durante esta Tesis Doctoral han sido llevadas a cabo usando diferentes potenciostatos. Algunas de las medidas fueron realizadas con un potenciostato  $\mu$ Stat 8000 (DropSens) conectado a un ordenador Pentium 4 2.4 GHz y controlado por el software DropView 8400 (versiones 1.0 y 2.0). Otras de las medidas fueron realizadas con un potenciostato Autolab PGSTAT12 (Metrohm Autolab) conectado a AMD K6 266 MHz y controlado por el software Autolab GPES versión 4.9. Este potenciostato contiene un modulo FRA (*Frequency Response Analyzer*) y fue utilizado para hacer las medidas por Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS). Las medidas voltamperométricas en la macroescala descritas en el [Capítulo 3](#) fueron llevadas a cabo con un potenciostato CH Instruments 760 controlado por el software específico de CH Instruments. Todas las medidas electroquímicas fueron realizadas a temperatura ambiente.

##### OTROS APARATOS

Además, se han empleado otros aparatos para diferentes tareas entre los que destacan:

- baño de ultrasonidos Elmasonic P (Elam GmbH) para dispersar los nanomateriales en las disoluciones específicas.
- microscopio electrónico de barrido JEOL 6610LV con microanálisis por EDX para la caracterización de electrodos y nanomateriales. Las imágenes SEM del [Capítulo 3](#) fueron obtenidas con un microscopio Zeiss SUPRA 55 FE-SEM (a 10 keV).

- microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JEM-2100 con microanálisis por EDX fue utilizado para estudiar la electrodeposición de plata sobre QDs en una rejilla de cobre recubierta con una membrana de carbono.
- goniómetro CAM 200 (KSV Instruments) para realizar medidas de ángulos de contacto de gotas.
- espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo Scientific) para registrar los espectros de absorción UV-Vis de los quantum dots.
- espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Agilent) para registrar los espectros de fluorescencia de los quantum dots, usando una longitud de onda de excitación de 350 nm con aberturas de excitación y emisión de 10 nm. Se utilizaron cubetas de cuarzo para realizar los análisis espectroscópicos.
- espectrómetro micro-Raman (Renishaw Invia) usando un diodo láser de estado sólido (Renishaw RL523C50) con una longitud de onda de excitación de 532 nm. El tamaño de haz incidente del láser fue alrededor de 760 nm en diámetro. La adquisición de espectros se llevó a cabo con una potencia de 0.5% y con un tiempo de integración de 30 s. Los mapas Raman fueron generados mediante la obtención de diferentes espectros de forma ordenada a lo largo de la superficie de la muestra. Normalmente, 1  $\mu\text{m}$  fue utilizado como la separación espacial (en el plano xy). Los mapas representados fueron generados mediante la relación entre la intensidad de las bandas a  $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$  y a  $\sim 13600\text{ cm}^{-1}$ , típicas del grafito, en función de las coordenadas xy de la superficie escaneada.
- microscopio de láser confocal LEICA SP8X para visualizar la fluorescencia de electrodos modificados con quantum dots. Un láser de 405 nm del microscopio fue utilizado para la excitación de los nanocristales y la fluorescencia fue detectada en un rango entre 635-675 nm. Los electrodos modificados fueron previamente fotoactivados bajo una lámpara UV de 6W y 365 nm durante 15 minutos.
- un espectrómetro fotoelectrónico de rayos-X Escalab 200R fue utilizado para las medidas de XPS de las TiPNPs funcionalizadas con cobre.
- las medidas de Dispersión dinámica de luz (DLS) y del potencial  $\zeta$  fueron llevadas a cabo con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

### 2.1.2 *Electrodos serigrafiados*

#### *Electrodos serigrafiados individuales*

Los electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) fueron adquiridos a DropSens. Estos dispositivos incorporan una configuración convencional de tres electrodos, impresos en un sustrato cerámico (3.4 x 1.0 cm). Tanto el electrodo de trabajo (con geometría de disco y un diámetro de 4 mm) como el electrodo auxiliar son fabricados con tinta de carbono, mientras que el electrodo de quasireferencia y los contactos eléctricos son de plata. Estos electrodos poseen una celda electroquímica de hasta 50  $\mu\text{L}$  (en este trabajo se ha utilizado siempre 40  $\mu\text{L}$ , a menos que se especifique lo contrario). Los SPCEs fueron conectados a los potenciostatos a través de conectores específicos, DRP-CAST1X8 para el potenciostato  $\mu\text{Stat}$  8000 y DRP-DSC para los demás potenciostatos. Todos los potenciales indicados a lo largo del trabajo son frente al electrodo de quasireferencia de plata de los electrodos serigrafiados, a excepción de los siguientes casos: en el capítulo [Capítulo 3](#) se utiliza un electrodo de quasireferencia formado por un hilo de Ag recubierto de AgCl, y en el capítulo [Capítulo 7](#) se utiliza un electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 4 M) fabricado en el laboratorio (y que se describe en un próximo apartado).

#### *Tarjetas serigrafiadas de 8 canales*

Las tarjetas serigrafiadas de 8 canales (8xSPCEs) fueron adquiridas a DropSens. Cada tarjeta está formada por ocho celdas electroquímicas de 3 electrodos (25  $\mu\text{L}$  de volumen) con electrodos de trabajo y auxiliar de carbono y electrodo de quasireferencia y contactos eléctricos de plata. Este dispositivo tiene unas dimensiones de 4.0 x 7.9 x 0.06 cm (longitud x anchura x altura) y el diámetro de los electrodos de trabajo, con una forma geométrica de disco, es de 2.56 mm. Las Figuras [Figura 2.1](#) y [Figura 2.2](#) muestran una imagen real y un esquema gráfico de la tarjeta serigrafiada, respectivamente. Las tarjetas de 8 canales fueron conectadas al potenciostato  $\mu\text{Stat}8000$  a través de un conector específico, DRP-CAST8X.

### 2.1.3 *Microscopio de celda electroquímica de barrido*

Las medidas de SECCM voltamperométrica se llevaron a cabo usando un instrumento fabricado en el *Warwick Electrochemistry and Interfaces Group*, empleando una tarjeta FPGA (PCIe 7852R, National Instruments) controlada a través de una interface LabVIEW (versión



Figura 2.1: Imagen de una tarjeta serigrafiada de 8 canales y su conector correspondiente.

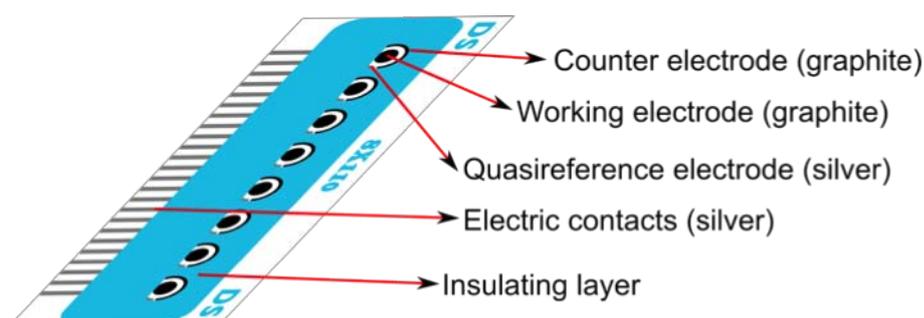


Figura 2.2: Diagrama esquemático de la tarjeta serigrafiada de 8 canales.

11.0, National Instruments) y un amplificador *lock-in* (SR830, Stanford Research Systems). Los capilares de doble canal para SECCM fueron fabricados tras cortar capilares *theta* (con una separación en el interior) de borosilicato (Harvard Apparatus) en una cortadora láser (P2000, Sutter Instruments). El diámetro de la sonda así fabricada fue de 700 nm aproximadamente como se muestra en la imagen de SEM obtenida (Figura 2.3). La punta del capilar fue silanizada en diclorodimetilsilano bajo una corriente de argón fluyendo por su interior, con el objetivo de incrementar la hidrofobicidad de las paredes externas<sup>215</sup>. El capilar fue rellenado con la disolución de medida (electrolito de fondo y especie indicadora) utilizando una jeringa de pocos  $\mu\text{L}$ . El menisco en la punta de la sonda forma una celda electroquímica cuando se encuentra en contacto con el sustrato que define el área del electrodo de trabajo. Las sondas fueron colocadas en un sistema piezoeléctrico de 3 ejes (NanoCube, Physik Instruments) para controlar su movimiento con gran precisión. Este sistema fue colocado dentro de una jaula de Faraday<sup>1</sup> para minimizar el ruido eléctrico. Un bipotenciostato fabricado en el mismo grupo fue empleado para controlar la diferencia de potencial (*bias*,  $V_2$ ) entre los QRCEs de Ag/AgCl. La diferencia de potencial aplicada (150 mV en este trabajo) es capaz de generar una corriente iónica ( $i_{\text{DC}}$ ) entre los

<sup>1</sup> En el apéndice se describe qué es una Jaula de Faraday.

QRCEs a través del menisco líquido que se forma entre los dos canales. La corriente de la superficie ( $i_{surf}$ ) fue medida por un electrómetro. El tiempo de respuesta y la calidad del ruido del electrómetro fueron controlados por un filtro de frecuencia variable. El potencial de la superficie ( $V_{surf}$ ) es controlado por el valor de  $V_1$  y por  $V_2$ , que se aplica desde el potencióstato, y viene definido por la siguiente expresión:

$$V_{surf} = - \left( V_1 + \frac{V_2}{2} \right) \quad (2.1)$$

La sonda es modulada en la posición  $z$  mediante el amplificador *lock-in* (123.8 Hz, 40 nm de amplitud). Esta modulación genera una componente alterna ( $i_{AC}$ ) de la corriente iónica. Una distancia constante entre la sonda y el sustrato se mantuvo al utilizar el valor de  $i_{AC}$  como magnitud para controlar la posición  $z$  de la sonda. Para realizar los experimentos de SECCM voltamperométrica, un modo pulsado llamado *hopping* (acercar-mantener-medir-retirar) fue empleado según se esquematiza en la [Figura 2.4](#). Este proceso implica los siguientes pasos: acercamiento de la sonda a la superficie del SPCE (a una velocidad de  $0.3 \mu\text{m s}^{-1}$ ), cuando el contacto del menisco con la superficie es detectado debido a la formación de la gota que genera un aumento de la  $i_{AC}$ , se aplica un barrido de potenciales al sustrato. A continuación, la sonda se retira (a una velocidad de  $0.8 \mu\text{m s}^{-1}$ ) de la superficie ( $4 \mu\text{m}$  en el eje  $z$ ) para evitar la rotura de la punta de la sonda con estructuras cercanas de la superficie electroda, y se mueve (a una velocidad de  $0.8 \mu\text{m s}^{-1}$ ) al siguiente punto de la superficie para realizar un nuevo *hopping* (acercar-mantener-medir-retirar). Este proceso se repite de manera ordenada a lo largo de la superficie del sustrato. Para evitar la superposición de las medidas, los diferentes *hopping* fueron realizados con una separación de  $3 \mu\text{m}$  entre cada punto en el plano  $xy$ . Con los datos de corrientes registrados a diferentes potenciales usando la voltamperometría cíclica, se pueden generar videos potenciodinámicos que muestran la actividad del sustrato.

#### 2.1.4 Electrodo de referencia de Ag/AgCl

Un electrodo de referencia de Ag/AgCl fue fabricado en el laboratorio y utilizado en el trabajo del [Capítulo 4](#) que consistió en la electrodeposición de plata sobre quantum dots, con el objetivo de mantener un potencial de referencia estable. Este electrodo fue colocado en una zona cercana al electrodo de trabajo para minimizar la resistencia incompensada de la celda ( $R_u$ ). El electrodo de referencia de Ag/AgCl fue fabricado usando un tip de

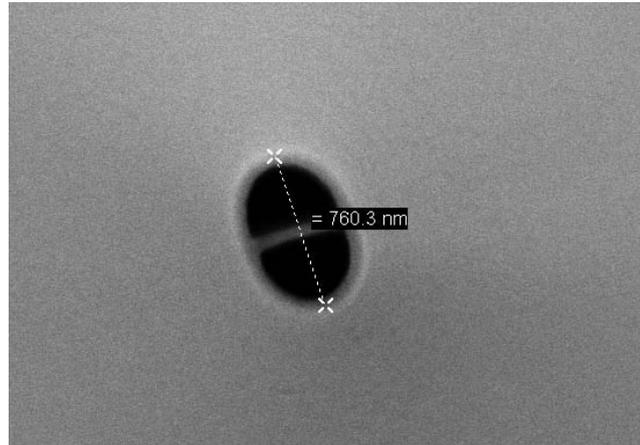


Figura 2.3: Imagen SEM del extremo de la sonda utilizada para los experimentos de SECCM.

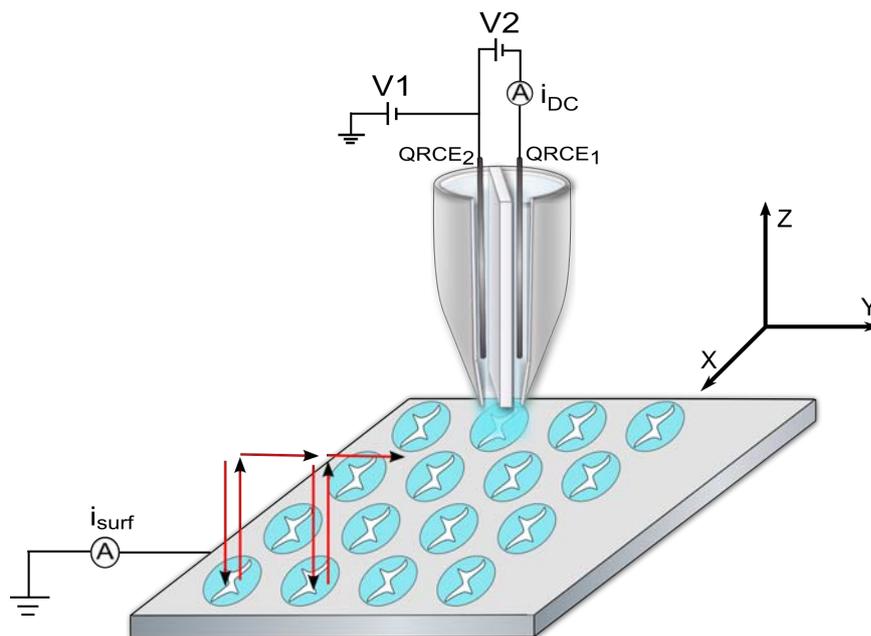


Figura 2.4: Esquema representando el *hopping-mode* utilizado con la técnica SECCM durante este trabajo.

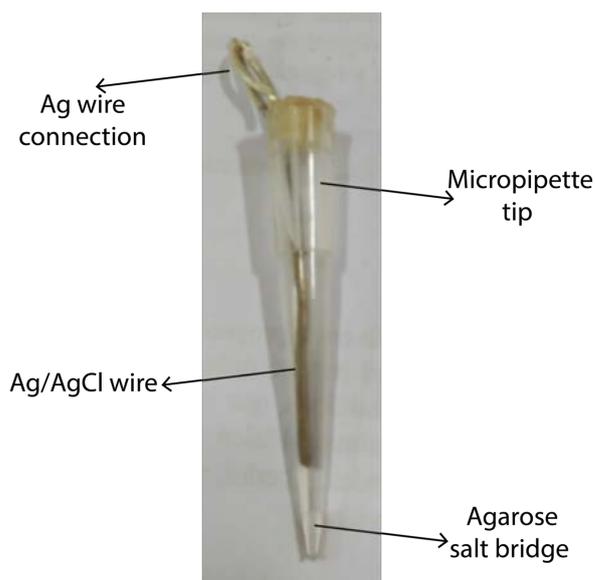


Figura 2.5: Imagen y esquema del electrodo de referencia de Ag/AgCl.

micropipeta de 10-100  $\mu\text{L}$  como contenedor. Un hilo de Ag ( $d = 1 \text{ mm}$ ) se recubrió con una película de AgCl mediante la aplicación de  $+0.8 \text{ V}$  durante 10 min en una disolución de KCl 1 M (usando un hilo de Pt como cátodo). El puente salino fue generado siguiendo un procedimiento encontrado en la literatura<sup>216</sup> aunque ligeramente modificado, que consiste en un gel de agarosa con  $\text{KNO}_3$ . Se añadieron 0.35 g de agarosa a 25 mL de una disolución de  $\text{KNO}_3$  0.5 M y la mezcla se calentó y agitó para disolver la agarosa. El tip de micropipeta se colocó en la disolución (en un microtubo de plástico), y se dejó enfriar para generar el gel de agarosa en el interior. Después, el tip se llenó con KCl saturado y el hilo de Ag/AgCl se colocó dentro de la disolución sin tocar el puente salino. El electrodo de referencia fue conectado al potenciostato usando una pinza de cocodrilo. Mientras no se utilizaba, el electrodo fue almacenado en una disolución saturada de KCl y evitando la luz. La buena reproducibilidad en los potenciales de pico de los voltamperogramas cuando se utilizó este electrodo durante los experimentos (en días diferentes) exhibió su buen comportamiento y estabilidad. En la [Figura 2.5](#) se muestra una imagen real de este electrodo.

#### 2.1.5 Software específico

- ImageJ fue empleado para la estimación del tamaño de las nanopartículas en las imágenes obtenidas por SEM y TEM a lo largo de esta Tesis Doctoral, y para estimar

el diámetro de los residuos dejados en la superficie electródica en las medidas por SECCM.

- Labview fue empleado como interface para controlar los distintos componentes del microscopio SECCM y para la obtención de los datos eléctricos. Se utilizaron diferentes programas de LabVIEW que fueron previamente desarrollados en el *Warwick Electrochemistry and Interfaces Group*.
- Matlab (R2014b, Mathworks) fue utilizado para el análisis y tratamiento de datos de las medidas obtenidas con SECCM y Raman y para representar todos los gráficos de datos presentados como figuras a lo largo de la Tesis Doctoral.

## 2.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los reactivos, disolventes y nanomateriales de carbono usados durante toda la Tesis Doctoral son enumerados en los siguientes apartados. Las disoluciones acuosas fueron siempre preparadas con agua ultrapura (Milli-Q) obtenida con un sistema de purificación Millipore Direct Q5™ (Millipore Ibérica). Todos los reactivos no mencionados específicamente fueron de grado analítico y se utilizaron según se recibieron sin mayor purificación.

### 2.2.1 *Reactivos comunes*

Los reactivos comunes utilizados durante esta Tesis Doctoral vienen enumerados en la [Tabla 2.2](#).

### 2.2.2 *Nanomateriales de carbono*

- Nanotubos de carbono de pared múltiple (**MWCNTs**) funcionalizados con grupos carboxilo (-COOH) fueron adquiridos a Nanocyl (ref. 3151).
- Nanofibras de carbono (**CNFs**) fueron suministradas por Grupo Antolín.
- Óxido de grafeno (**GO**) fue suministrado por Nanoinnova Technologies.

| Adquiridos a Merck                           |   |  |
|--|---|--|
| Nitrato de bismuto(III)                      | Acetato de cadmio (II)                      | Hidróxido de sodio   |
| Ácido clorhídrico, 37 %                      | Ácido sulfúrico, 97 %                       | Ácido nítrico, 65 %  |
| N,N-dimetilformamida<br>(DMF)                | Ácido acético, 100 %                        | Ácido perclórico (70 %)  |
| Amoníaco (25 %)                              | Etanol seco                                 | Yoduro de potasio  |
| Cloruro de potasio                           | Tween 20                                    |  |
| Adquiridos a Sigma-Aldrich                   |   |  |
| Tris(hydroximetil)-<br>aminometano<br>(Tris) | Cloruro de antimonio(III)                   | d-Biotina  |
| Ferrocianuro potásico                        | Disolución estándar de<br>Bi(III)           | Ferricianuro potásico  |
| Cloruro de potasio                           | CdSe QDs (Lumidot CdSe)                     | Cloroformo anhidro   |
| Polvo de selenio                             | Óxido de Cadmio                             | Nitrato de plata   |
| Óxido de trioctilfosfina<br>(TOPO)           | Trioctilfosfina (TOP, 90 %)                 | Ácido fosfórico<br>(H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , cristalino) |
| Docusato de sodio (AOT)                      | Butóxido de titanio (TBOT)                  | Cloruro de<br>hexaaminrutenio(III)                               |
| Hidrocloruro de dopamina                     | Reguladora de fosfato 50<br>mM pH 7.2 (PBS) | N-(3-Dimetilaminopropil)-<br>N'-etilcarbodiimida<br>(EDC)        |
| Imidazol                                     |   |  |
| Adquiridos a otras empresas                  |   |  |
| Ácido hexilfosfónico (HPA)<br>(Alfa Aesar)   | Diclorodimetilsilano (Acros<br>Organics)    |  |

Tabla 2.2: Reactivos comunes utilizados durante esta Tesis Doctoral

### 2.2.3 *Reactivos biológicos*

#### Adquiridos a Sigma-Aldrich

- Albúmina de suero bovino - fracción V (**BSA**).
- Estreptavidina (66 kDa) (**STV**).
- $\beta$ -caseína (98 %, de leche bovina).

#### Adquiridos a Life Technologies

- Conjugado Qdot® 655 - Biotina (**biotina-QD**).
- Conjugado Qdot® 655 - F(ab')<sub>2</sub> anti-humana IgG (H+L) (**anti-IgG-QD**).
- Conjugado Qdot® 655 - estreptavidina (**QD-STV**).
- Anticuerpos anti-IgA humana biotinilado (**anti-IgA-BT**).
- Anticuerpos anti-IgG humana biotinilado (**anti-IgG-BT**).

#### Adquiridos a Zedira

- Transglutaminasa tisular humana (producida de forma recombinante en células de insectos) (**tTG**).

#### Adquiridos a Phadia

- Kit ELISA Varelista Celikey IgG. Cada kit contenía seis muestras estándar de suero humano (0, 3, 7, 16, 40, 100 U mL<sup>-1</sup>) y un control positivo y negativo.
- Kit ELISA Varelista Celikey IgA. Cada kit contenía seis muestras estándar de suero humano (0, 3, 7, 16, 40, 100 U mL<sup>-1</sup>) y un control positivo y negativo.

#### Adquiridos a Fisher Scientific

- Neutravidina (**NTV**).

#### 2.2.4 Disoluciones

A continuación se describen las disoluciones reguladoras o más especiales utilizadas a lo largo del trabajo:

- Disolución reguladora de acetato de sodio. Se utilizó esta reguladora a diferentes pH y concentraciones, pero, en la mayoría de los casos fue de 0.1 M y pH 4.5.
- Disolución reguladora de Tris-HCl (**Tris**) en concentración 0.1 M y pH 7.4.
- Disolución reguladora de fosfato (**PBS**) en concentración 0.1 M y pH 7.0.
- La dispersión de MWCNTs fue preparada mezclando 1 mg de MWCNTs-COOH con 1 mL de una mezcla DMF:H<sub>2</sub>O (1:1) por sonicación en un baño de ultrasonidos durante 2 h. Una dilución de esta dispersión fue hecha para obtener una concentración final de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> por sonicación durante 30 minutos.
- Las dispersiones de GO y CNFs fueron realizadas directamente en H<sub>2</sub>O hasta una concentración de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> y sonicadas durante 30 minutos.
- Las dispersiones de TiPNPs y MTiPNPs fueron hechas en H<sub>2</sub>O con sonicación en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para obtener una suspensión coloidal homogénea.

A lo largo del texto se indican específicamente el resto de disoluciones utilizadas.

### 2.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Por la heterogeneidad de esta Tesis Doctoral y la cantidad de diferentes procedimientos experimentales utilizados, los más específicos serán descritos en cada capítulo, y a continuación se detallan los más generales que han podido ser utilizados en uno o varios de los capítulos de los resultados y discusión.

#### 2.3.1 Nanoestructuración de electrodos

A lo largo de la Tesis Doctoral se lleva a cabo la modificación de electrodos serigrafados con diferentes tipos de nanomateriales. Esta modificación se realiza siempre mediante

adsorción física que se produce tras depositar una gota de una dispersión del nanomaterial sobre el electrodo y dejarlo hasta secado completo. A continuación se detallan los procedimientos para los diferentes tipos de nanomateriales:

#### *Nanomateriales de carbono*

La modificación de SPCEs con nanotubos de carbono fue llevada a cabo siguiendo un método desarrollado por Fanjul-Bolado et al.<sup>217</sup>, que consistía en depositar una gota de 4  $\mu\text{L}$  sobre la superficie del electrodo de trabajo hasta secado completo. La modificación de SPCEs con óxido de grafeno o nanofibras de carbono se llevó a cabo depositando una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de la dispersión específica en la superficie del electrodo de trabajo. La disolución se dejó a temperatura ambiente hasta secado completo. Los electrodos así modificados fueron lavados con agua ultrapura y almacenados a temperatura ambiente.

#### *Nanopartículas de fosfato de titanio*

La modificación de los electrodos de trabajo de las tarjetas serigrafiadas con TiPNPs y MTiPNPs se llevó a cabo depositando una gota de 2  $\mu\text{L}$  de la dispersión de TiPNPs o MTiPNPs en la superficie del electrodo de trabajo. La disolución se dejó a temperatura ambiente hasta su secado completo.

#### *Quantum dots*

La modificación de los electrodos serigrafiados con QDs que se utilizan en el [Capítulo 7](#) se lleva a cabo de la siguiente manera: una gota de 10  $\mu\text{L}$  de una dispersión de QDs se añade sobre el electrodo de trabajo cubriéndolo completamente. A excepción de las medidas en las que se varía la concentración de QDs o se indica específicamente, en el resto de los casos se utiliza una concentración de 10 nM. Los resultados presentados fueron obtenidos con una disolución de QD-BT, pero el mismo comportamiento se encontró con otras especies de QDs como QDs-STV o anti-IgG-QD.

#### 2.3.2 *Síntesis de quantum dots de CdSe y CdSe/ZnS*

Se sintetizaron QDs de CdSe usando CdO como precursor siguiendo la ruta organometálica descrita por el grupo de Peng<sup>218</sup> con ligeras modificaciones e ilustrada en la [Figura 2.6](#). Brevemente, 1.23 mmol de CdO, 0.6 g de HPA y 17.5 g de TOPO fueron añadi-

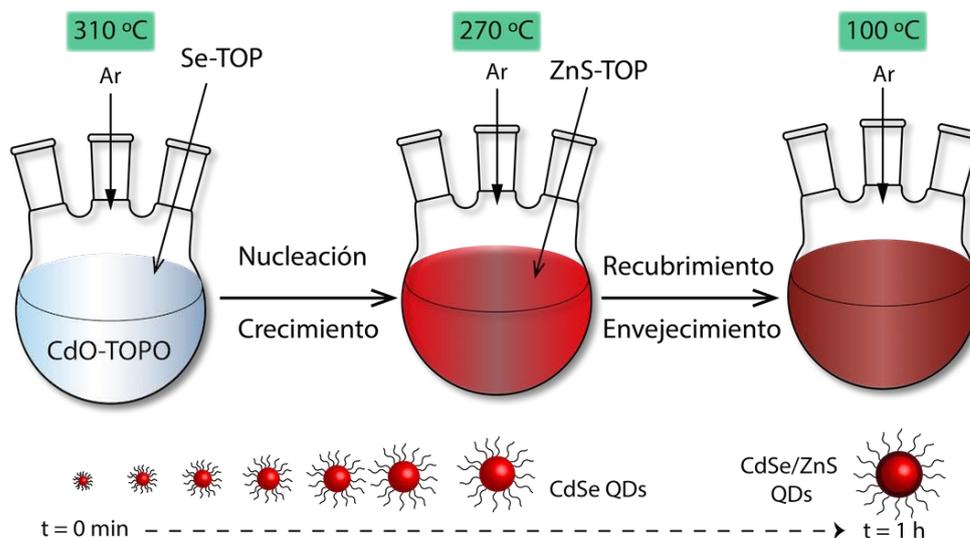


Figura 2.6: Esquema de la síntesis organometálica de quantum dots de CdSe y CdSe/ZnS.

dos a un matraz de tres bocas de 250 mL. La mezcla fue calentada hasta 300-320 °C bajo un flujo de argón durante 15-20 min para permitir la disolución completa del CdO en HPA y TOPO. Tras disminuir la temperatura de la disolución hasta 270 °C, se inyectó rápidamente 6 mL de una disolución patrón de selenio, preparada en caja seca de atmósfera de Ar tras disolver 1.63 mmol de polvo de selenio en 7.5 mL de TOP. Tras la inyección, los nanocristales se dejaron crecer desde 5 a 15 min a 250 °C dependiendo del tamaño del núcleo deseado y por tanto, de la longitud de onda de emisión de fluorescencia deseada. En el caso de los QDs «core-shell» de CdSe/ZnS, el núcleo de CdSe fue sintetizado siguiendo la estrategia descrita. Una vez el proceso de crecimiento alcanza el tamaño de núcleo deseado y con el objetivo de generar el recubrimiento de ZnS, se añadió lentamente, a una temperatura de 250 °C, 7.5 mL de una disolución patrón de sulfuro de zinc (Zn/S/TOP) (preparada en atmósfera de Ar tras mezclar 1.18 mmol de hexametildisilano, 8.34 mmol de dietil zinc y 10.25 mL de TOP). A continuación, se enfrió la mezcla a 100 °C durante una hora. Para eliminar el exceso de los precursores que no reaccionan, se centrifugó para precipitar los QDs dispersados. Se descartó el sobrenadante y los QDs precipitados fueron redispersados en cloroformo anhidro y almacenados a temperatura ambiente evitando el contacto con la luz antes del uso.

#### SOLUBILIZACIÓN ACUOSA DE QDs

Con el objetivo de hacer las nanopartículas hidrofílicas para hacerlas compatibles con un medio acuoso, los QDs fueron modificados superficialmente con un polímero anfífilo (basado en grupos funcionales de anhídrido polimaleico) que interacciona con las cadenas

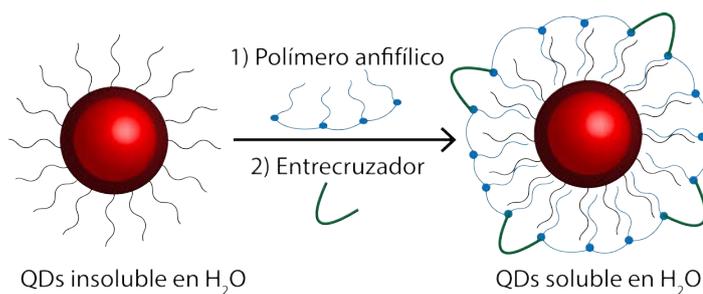


Figura 2.7: Funcionalización de los quantum dots con un polímero anfifílico.

TOP/TOPO de los QDs, siguiendo un procedimiento descrito en la literatura<sup>219</sup> e ilustrado en la [Figura 2.7](#). Brevemente, se añade la disolución de QDs en cloroformo anhidro a una disolución del polímero. El polímero anfifílico fue sintetizado siguiendo un procedimiento previamente publicado<sup>220</sup>. Se agita para su homogeneización, se calienta a 60 °C para favorecer el recubrimiento, y se elimina el disolvente en un rotavapor. Se obtiene un sólido que se redisuelve en 3 mL de una disolución 0.02 M de entrecruzador (bis-hexanoetilentriamina) para cerrar la estructura y estabilizar el recubrimiento polimérico y se vuelve a eliminar el disolvente. El producto se redisuelve en una disolución reguladora de borato sódico 50 mM pH 12 en medio acuoso.

### 2.3.3 Determinación espectroscópica de la concentración y tamaño de quantum dots

El método de Peng<sup>120,218</sup> permite estimar el tamaño de nanopartícula en QDs de Cd y su concentración, a partir de la medida del espectro de absorbancia. Para el caso de los QDs de CdSe, se aplica la siguiente ecuación:

$$D \text{ (nm)} = (1.6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2.6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1.6242 \times 10^{-3})\lambda^2 - (0.4277)\lambda + 41.57$$

donde D es el diámetro de la nanopartícula y  $\lambda$  es la longitud de onda del primer excitón del espectro de absorbancia.

Con el valor para el diámetro del núcleo de los QDs, se puede obtener el valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) por mol de nanopartícula ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) con la siguiente ecuación:

$$\epsilon = 5857 (D)^{2.65}$$

y aplicando la ley de Lambert-Beer se puede obtener la concentración de nanopartículas en disolución:

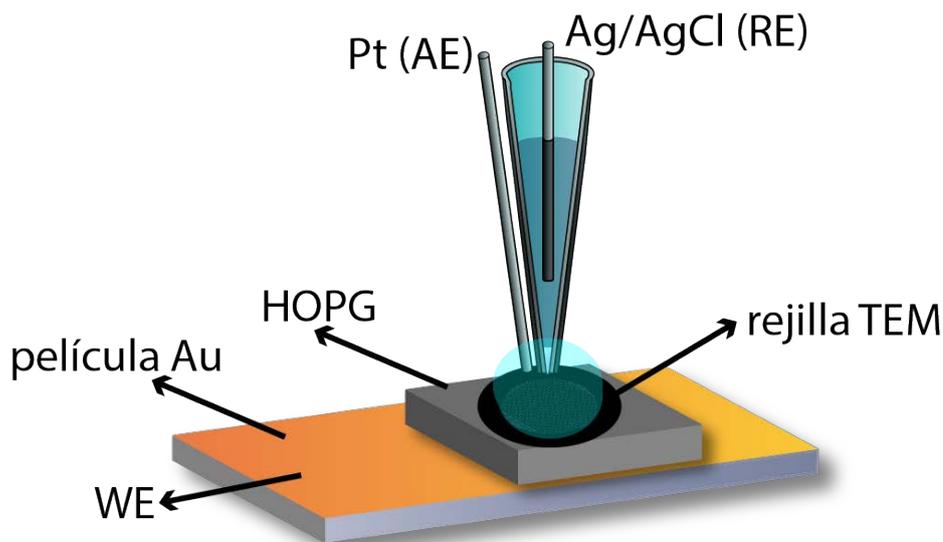


Figura 2.8: Esquema del sistema utilizado para la electrodeposición en rejillas de TEM.

$$A = \epsilon CL$$

donde  $A$  es la absorbancia a la longitud de onda del primer excitón,  $C$  es la concentración en partículas ( $\text{mol L}^{-1}$ ) y  $L$  es la longitud de paso óptico utilizada en la medida.

#### 2.3.4 Electrodeposición de plata sobre rejillas de TEM

La electrodeposición metálica sobre rejillas de TEM ya había sido previamente descrita<sup>221</sup> y un sistema similar fue utilizado en este trabajo. Brevemente, la rejilla de TEM fue colocada sobre un sustrato de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) con la zona de la membrana de carbono hacia arriba. El sustrato de HOPG se colocó sobre una lámina metálica recubierta de oro que fue conectada al potenciostato. La disolución de plata se colocó sobre la rejilla, haciendo contacto sólo con la membrana de carbono, que actuó como electrodo de trabajo. Un cable de platino, funcionando como electrodo auxiliar, fue acoplado al electrodo de referencia de Ag/AgCl descrito en un apartado anterior.

#### 2.3.5 Representación del modelo de nucleación de Scharifker-Hills

En la [Figura 2.9](#) se muestra, en primer lugar, una hipotética respuesta cronoamperométrica para una electrodeposición metálica. Para estudiar la nucleación y crecimiento de las

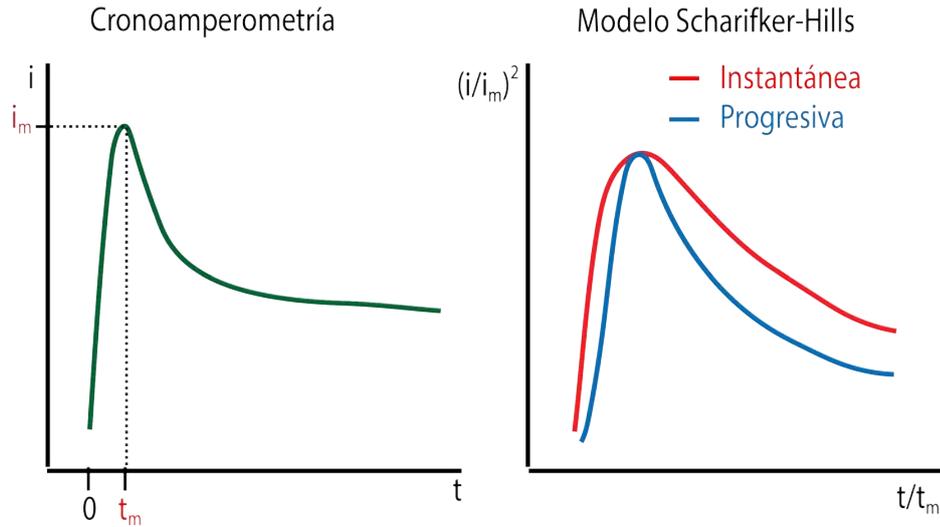


Figura 2.9: Curva cronoamperométrica obtenida para la electrodeposición metálica y representación del sistema modelo de Scharifker-Hills.

partículas electrodepositadas se puede usar el modelo teórico de Scharifker-Hills<sup>222</sup>, descrito en la Introducción. De forma experimental, este modelo puede evaluarse mediante la transformación de la respuesta cronoamperométrica a una curva representando los parámetros  $t/t_m$  en el eje de abscisas, mientras que se representa  $(i/i_m)^2$  en el eje de ordenadas, siendo  $i$  la corriente cronoamperométrica a un tiempo  $t$ , y  $t_m$  es el tiempo al que aparece la corriente máxima ( $i_m$ ), como se ilustra en la figura mencionada.

La nucleación instantánea en este modelo se describe por la ecuación 2.2, mientras que la nucleación progresiva puede ser expresada por la ecuación 2.3.

$$\left(\frac{i}{i_m}\right)^2 = 1,9542 \left(\frac{t}{t_m}\right)^{-1} \left\{1 - \exp\left[-1,2564 \left(\frac{t}{t_m}\right)\right]\right\}^2 \quad (2.2)$$

$$\left(\frac{i}{i_m}\right)^2 = 1,2254 \left(\frac{t}{t_m}\right)^{-1} \left\{1 - \exp\left[-2,3367 \left(\frac{t}{t_m}\right)\right]\right\}^2 \quad (2.3)$$

Los curvas  $i-t$  de las medidas cronoamperométricas del Capítulo 7 fueron analizadas con estas expresiones utilizando los valores experimentales obtenidos para  $i_m$  y  $t_m$ , para estudiar la nucleación de partículas de plata. Por otro lado, este modelo también predice el número de sitios de nucleación siguiendo por las siguientes ecuaciones para la nucleación instantánea:

$$i_m = 0,6382nFDC(kN)^{1/2} \quad (2.4)$$

$$t_m = \frac{1,2564}{N\pi kD} \quad (2.5)$$

$$k = \left( \frac{8\pi CM}{\rho} \right)^{1/2} \quad (2.6)$$

donde  $n$  es el número de electrones involucrados,  $F$  es la constante de Faraday,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $C$  es la concentración de la especie en la disolución,  $N$  es la densidad de núcleos (número de núcleos por área superficial),  $M$  es la masa molecular de la especie, y  $\rho$  es la densidad del material depositada.

El número de sitios de nucleación en un modelo progresivo viene descrito por las siguientes ecuaciones:

$$i_m = 0,4615zFD^{3/4}C(k'AN_\infty)^{1/4} \quad (2.7)$$

$$t_m = \left( \frac{4,6733}{AN_\infty\pi k'D} \right)^{1/2} \quad (2.8)$$

$$k' = \frac{4}{3} \left( \frac{8\pi CM}{\rho} \right)^{1/2} \quad (2.9)$$

donde  $N_\infty$  es el densidad de los sitios activos.

### 2.3.6 Síntesis de nanopartículas de fosfato de titanio

La síntesis de las nanopartículas de fosfato de titanio fue llevada a cabo siguiendo un procedimiento encontrado en la literatura<sup>188</sup> y adaptado a las instalaciones disponibles. Este procedimiento se describe de forma detallada a continuación:

1. Dentro de una caja seca (*glovebox*), se disuelve 1 g de AOT (2.25 mmol) en 6.3 mL de etanol seco (5 g,  $d = 0.789 \text{ g mL}^{-1}$ ) en un matraz Schlenk que se cierra con un tapón de goma. Se agita manualmente el matraz hasta la disolución completa.
2. Dentro de la caja seca se añaden 2 g de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a otro matraz Schlenk, y el matraz se cierra con un tapón de goma tras introducir un agitador magnético.
3. Los dos matraces se conectan a una línea de nitrógeno y según el sistema esquematizado en la [Figura 2.10](#), se transfiere la disolución del AOT al matraz que contiene

el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  mediante un capilar metálico dónde la presión del nitrógeno empuja la disolución. De esta manera, se evita el contacto de la disolución con el aire y no es necesario realizar este tipo de acciones dentro de la caja seca.

4. La disolución se agita durante 6 horas, durante las cuales se forma un precipitado blanco. Para obtener la disolución, ésta se transfiere usando un sistema con capilar similar al anterior, pero en el cual el extremo final tiene un filtro para evitar la transferencia del producto sólido.
5. Dentro de la caja seca, se colocan 0.35 g de TBOT en otro matraz Schlenk, empleando un cuentagotas. Se añaden 6.3 mL de etanol seco, se cierra el matraz con un tapón de goma y se agita manualmente para homogeneizar las dos fases líquidas.
6. Con el sistema capilar/nitrógeno se transfiere la disolución de TBOT al matraz que contiene la disolución de fosfatos. Se agita manualmente para homogeneizar.
7. El matraz se coloca en un baño de aceite, con un sistema de reflujo. En el extremo del sistema de reflujo se coloca un borboteador con vaselina. El baño de aceite se calienta a 80 °C, y se deja la disolución a reflujo durante 15 horas. Se forma un precipitado blanco (ver [Figura 2.11](#)).
8. El contenido del matraz se coloca en tubos para centrifugar. Se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos (o más tiempo si el producto no ha precipitado en el fondo del tubo). Se separa y se elimina el etanol y se lava/centrifuga/separa tres veces con etanol absoluto. Se comprueba que el pH del sólido (en una gota de agua) no está ácido, señal de que la mayor parte del  $\text{H}_3\text{PO}_4$  se ha eliminado.
9. Tras el último lavado con etanol, se añade dietil-éter para extraer el producto y se transfiere a un matraz que se lleva a evaporar en un sistema conectado a una bomba de vacío. El producto sólido obtenido se deja a 80 °C durante unas 12 horas para su secado final.

Aunque el mecanismo de esta reacción no se ha estudiado en detalle, se espera que el surfactante sea el responsable principal de formar las nanopartículas. Un mecanismo de formación podría ser el siguiente: el surfactante protonado en etanol interacciona con los fosfatos cargados negativamente de manera similar a la formación de micelas. Cuando el precursor de titanio se añade a la disolución, el crecimiento de las nanopartículas es

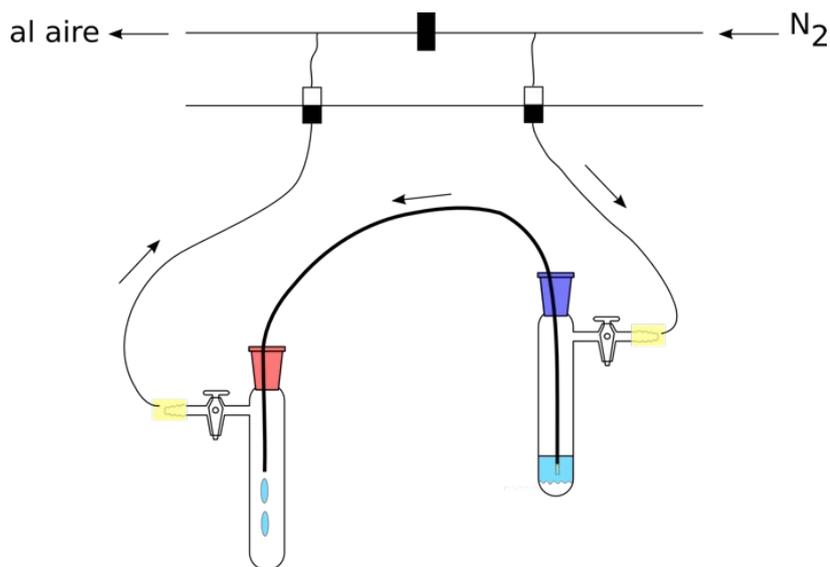


Figura 2.10: Esquema del sistema utilizado para la transferencia de la disolución en atmósfera inerte.

dirigido por las cadenas hidrocarbonadas de los surfactantes alrededor de los fosfatos, conduciendo a nanopartículas esféricas.

### 2.3.7 Funcionalización de nanopartículas de fosfato de titanio

Las nanopartículas de fosfato de titanio utilizadas durante esta Tesis Doctoral se modificaron con diferentes metales (Cd, Ag, Hg, Cu, Bi) en primer lugar, y algunas de ellas, para aplicaciones bioanalíticas, también se modifican con neutravidina.

#### *Funcionalización con metales*

El intercambio iónico que se lleva a cabo para la introducción de metales en la estructura de las TiPNPs se realiza según un procedimiento encontrado en la literatura<sup>190</sup>, pero que se detalla a continuación en más detalle:

1. Se prepara, en un matraz Schlenk, 17 mL de una disolución 10 mM de del metal específico en H<sub>2</sub>O. Las sales metálicas utilizadas fueron nitratos de plata, cadmio y bismuto y acetatos de cadmio, mercurio y cobre.
2. Se dispersan 40 mg de TiPNPs en 1 mL de H<sub>2</sub>O (40 mg mL<sup>-1</sup>). Se emplea un baño de ultrasonidos para obtener una dispersión homogénea (4 min, 37 Hz, 90 W). Se



Figura 2.11: Producto obtenido en la síntesis de las TiPNPs.

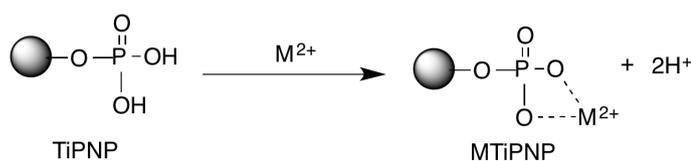


Figura 2.12: Posible mecanismo del intercambio catiónico de las TiPNPs.

añade la dispersión de TiPNPs al matraz junto a la disolución del metal, empleando una micropipeta.

3. Se coloca el matraz en un baño de aceite a 50 °C con agitación durante 24 horas.
4. Se decanta la dispersión y se lava el producto precipitado con H<sub>2</sub>O durante 3 veces. Se obtienen las nanopartículas mediante centrifugación y lavado con H<sub>2</sub>O, un lavado final con éter y secado a vacío.

Un posible esquema de la reacción de intercambio se representa en la [Figura 2.12](#), donde se ilustra la extracción de protones de las nanopartículas para unir el catión metálico.

#### *Funcionalización con neutravidina*

Se lleva a cabo un método para la funcionalización de las MTiPNPs utilizando una estrategia similar a un método utilizado para funcionalizar los grupos fosfato de hebras

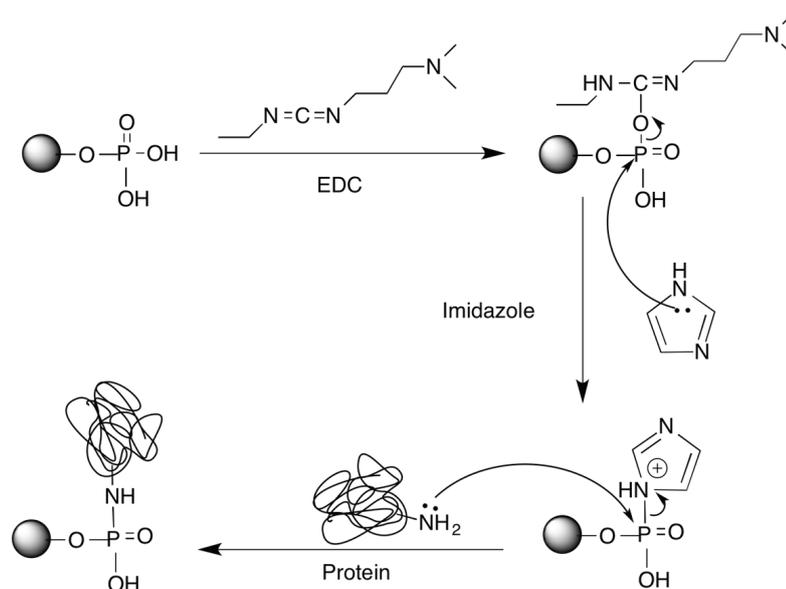


Figura 2.13: Posible esquema de la reacción covalente entre los grupos fosfato de las TiPNPs y una proteína.

de ADN utilizando imidazol que se encontró en la literatura<sup>223</sup>. Un posible esquema de este mecanismo se representa en la Figura 2.13 y el procedimiento seguido para esta funcionalización fue el siguiente:

1. Se dispersan 5 mg de TiPNPs en 200  $\mu\text{L}$  de imidazol 0.1 M pH 6, por sonicación en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos (100 W y 37 Hz) para obtener una suspensión coloidal homogénea.
2. Sobre esta dispersión se añaden rápidamente 2 mg de EDC sólido y se homogeneiza la disolución.
3. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de imidazol para contrarrestar un posible cambio de pH con la reacción con EDC, y se agita la disolución durante 2 horas a unas 300 rpm.
4. Se añade sobre la disolución anterior 250  $\mu\text{L}$  de neutravidina ( $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en imidazol, y se agita durante 20 horas para llevar a cabo la unión con la proteína.
5. Se centrifuga, se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  y PBS y se redispersa el producto en 5 mL de PBS 0.1 M pH 7.0 (concentración final de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Por otro lado, se llevó a cabo la funcionalización con neutravidina de estas nanopartículas siguiendo un método previamente publicado en la literatura<sup>191</sup>, cuyo mecanismo se ilustra en la Figura 2.14. Brevemente, el método consta de las siguientes etapas:

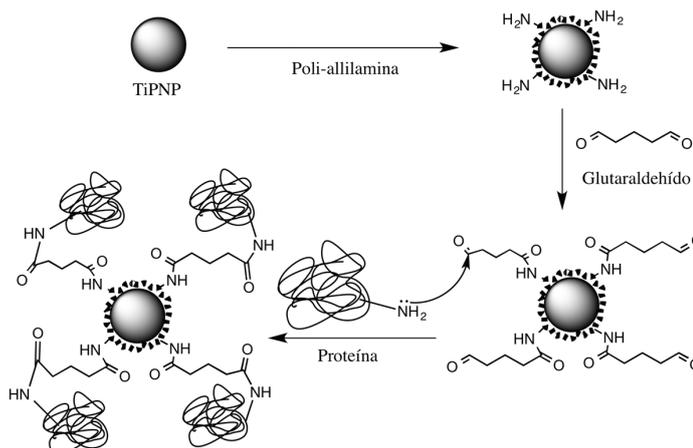


Figura 2.14: Posible esquema de la unión de la proteína con las TiPNPs tras su atrapamiento polimérico.

1. Se dispersan 5 mg de MTiPNPs en 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y a continuación se añaden otros 500  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de PAH (2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Se colocan en un baño de ultrasonidos durante 20 min (37 Hz, 100 W).
2. Se centrifuga, se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  (tres veces), se redispersan las nanopartículas en 500  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído (0.25 % en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se mantiene en un baño de ultrasonidos durante 5 min.
3. Se centrifuga, se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  y PBS, y se redispersan en 500  $\mu\text{L}$  de una disolución de neutravidina (0.05 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) en PBS. Se deja reaccionar durante 6 horas en agitación constante (alrededor de 300 rpm).
4. Se centrifuga, se lava con PBS y se redispersa el producto en 5 mL de PBS 0.1 M pH 7.0 (concentración final de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ).

Las MTiPNPs funcionalizadas con neutravidina fueron almacenadas a  $4^\circ\text{C}$  en la disolución acuosa dentro de un microtubo de *low-binding* y con una concentración de 0.1 % de BSA. Tras evaluar los resultados de la estabilidad de las TiPNPs en disolución descritos en el [Capítulo 8](#), se decidió utilizar estas disoluciones solamente en un plazo de 10 días desde la funcionalización.

### 2.3.8 *Tratamiento de muestras reales*

En el [Capítulo 10](#) se lleva a cabo la determinación no enzimática de glucosa utilizando SPCEs modificados con CuTiPNPs en muestras reales como miel y plasma sanguíneo. Estas muestras tuvieron que ser tratadas antes de llevar a cabo las medidas. Para las muestras de miel, 0.4 g de miel fueron diluidos en 25 mL de H<sub>2</sub>O y a continuación, se diluyeron 100 veces en NaOH 0.1 M. Una alícuota de 40 µL de esta disolución fue añadida al electrodo para llevar a cabo el análisis electroquímico. Para las muestras de sangre, con el objetivo de separar el plasma, la muestra fue centrifugada a 10000 rpm durante 3 minutos. El plasma (sobrenadante) fue recogido con una micropipeta y fue diluido 10 veces en NaOH 0.1 M. Para las adiciones estándar, 500 µL del plasma diluido fueron añadidos a 500 µL de una disolución de 0, 100, 300 y 700 µM de glucosa en NaOH 0.1 M. 40 µL de esta disolución fue colocada sobre el electrodo para realizar las medidas electroquímicas.

### 2.3.9 *Medidas por espectroscopía de impedancia electroquímica*

#### MODIFICACIÓN HIDROFÍLICA DE SPCEs CON TTG

Espectroscopia de impedancia electroquímica fue utilizada con el objetivo de obtener información cualitativa del recubrimiento proteico obtenido tras la modificación de la superficie de electrodos serigrafiados con transglutaminasa como se describe en el [Capítulo 6](#). Se utilizaron electrodos serigrafiados individuales para llevar a cabo estas medidas. La modificación hidrofílica de SPCEs fue realizada siguiendo la metodología descrita en el capítulo mencionado, pero usando 10 µL de la disolución de tTG (como es habitual para SPCEs individuales, ya que es el volumen necesario para recubrir completamente la superficie del electrodo de trabajo). La modificación convencional (los SPCEs no fueron lavados con disolución reguladora antes de la inmovilización de tTG) se llevó a cabo depositando una alícuota de 10 µL de una disolución de tTG (en Tris). En ambos casos se utilizó una concentración de 0.1 mg mL<sup>-1</sup> y los electrodos modificados se almacenaron a 4 °C durante la noche. Tras lavar los SPCEs con Tris, 40 µL de una disolución de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (5 mM) preparada en KCl 0.1 M fue colocada en la celda electroquímica y se realizaron medidas EIS aplicando un potencial de +0.12 V y una amplitud AC de 10 mV. Los datos de impedancia obtenidos fueron ajustados al circuito equivalente de la [Figura 2.15](#), y el valor de

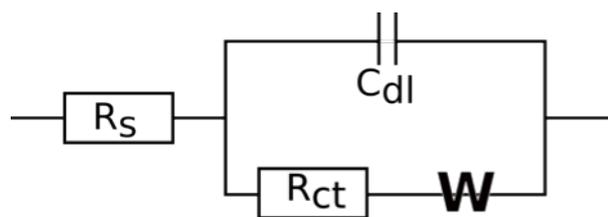


Figura 2.15: Circuito equivalente empleado para ajustar los datos de EIS.

la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) fue elegido para comparar el recubrimiento proteico de ambas metodologías.

#### ESTUDIO DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON MTiPNPs

Con el objetivo de analizar la superficie electródica de los electrodos serigrafados modificados con TiPNPs y MTiPNPs (modificadas con Ag y Cu), se llevó a cabo un estudio mediante EIS de estos electrodos. Para ello, se depositaron 40  $\mu\text{L}$  de una disolución 5 mM del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  preparada en KCl 0.1 M sobre la celda electroquímica y se realizaron las medidas de EIS aplicando un potencial de +0.12 V y una amplitud AC de 10 mV. Los resultados de impedancia obtenidos fueron ajustados al circuito equivalente de Randles (Figura 2.15).

##### 2.3.10 Cálculo del límite de detección

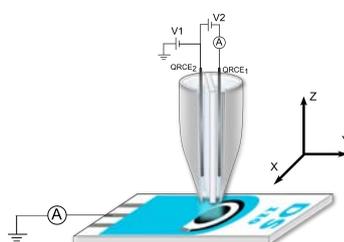
Aunque no es exactamente un procedimiento experimental, el cálculo del límite de detección (LOD) de los métodos analíticos desarrollados en este trabajo se realiza en varias ocasiones, y por tanto, es importante explicar la metodología seguida para calcularlo. En la mayoría de los casos, el LOD se calcula a partir de la recta de calibrado como la concentración que da una señal analítica de tres veces la desviación estándar de la estima<sup>37</sup>. En los casos donde una señal decreciente con la concentración fue obtenida (como en los ensayos competitivos), el LOD fue estimado como la concentración que da una señal que es el 90% de la señal máxima.

CARACTERIZACIÓN DE  
ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE  
CARBONO



# CORRELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ELECTROQUÍMICA EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

---



## 3.1 INTRODUCCIÓN

Aunque ampliamente utilizados en diferentes aplicaciones, poco se conoce sobre el comportamiento electroquímico a nivel estructural de los electrodos serigrafados. Este tipo de electrodos presentan una superficie muy heterogénea que puede producir una respuesta electroquímica muy variada, mientras que los estudios en la macroescala<sup>1</sup> publicados hasta ahora solamente proporcionan información promediada. Por tanto, el estudio de la actividad localizada con técnicas electroquímicas microscópicas a lo largo de la superficie de los electrodos serigrafados puede ser muy importante para poder explicar con mayor exactitud y de forma más completa su comportamiento electroquímico global.

En este capítulo, se utilizó SECCM voltamperométrica en *hopping-mode* para estudiar la actividad electroquímica localizada de electrodos serigrafados de carbono con el objetivo de explicar la influencia de la heterogeneidad de la superficie en la respuesta electroquímica. Hexaaminrutenio y dopamina, que experimentan diferentes procesos de transferencia

<sup>1</sup> En este capítulo, la macroescala se refiere a hacer las medidas de forma convencional usando 40  $\mu\text{L}$  de disolución y la celda electroquímica integrada de la tarjeta serigrafada.

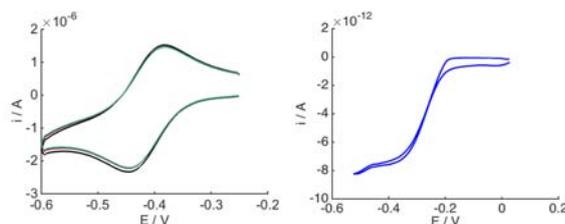


Figura 3.1: Voltamperogramas cíclicos para la reducción de 250  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en la macroescala (a) y en una configuración SECCM (b). La zona específica de la superficie electroquímica en la cual se obtuvo esta medida se muestra en la [Figura 3.2](#).

electrónica, fueron utilizados para evaluar el comportamiento electroquímico a diferentes velocidades de barrido. Utilizando SECCM voltamperométrica y una sonda sub-micrométrica fue posible visualizar y obtener información de la actividad electroquímica a diferentes potenciales a lo largo de toda la superficie serigrafiada. El contacto de la sonda con la superficie deja un residuo salino en el electrodo, que puede ser utilizado para relacionar, exactamente, la medida electroquímica con la estructura superficial. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y micro-espectroscopia Raman fueron empleadas como técnicas para evaluar las características estructurales de los electrodos serigrafiados de carbono y su efecto en la respuesta electroquímica.

### 3.2 ELECTROQUÍMICA DEL HEXAMINRUTENIO EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

Para estudiar el comportamiento electroquímico del  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs, en primer lugar, se investigó la reacción de reducción de esta especie en la macroescala. Se registraron una serie de voltamperogramas cíclicos consecutivos para la reducción de 250  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  que se muestran en la [Figura 3.1A](#). Estos voltamperogramas exhiben la forma característica de una difusión lineal de las especies hacia el electrodo. La diferencia de potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) se mantuvo en un rango entre 60-70 mV. Estos valores son cercanos al valor teórico que se obtendría para un proceso de un electrón controlado por difusión (59 mV), y sugieren que los SPCEs tienen una cinética rápida y buen comportamiento electroquímico. Casi no se observa variación en las corrientes de pico o en los potenciales de pico para las medidas consecutivas, que apunta a una baja contaminación de la superficie electroquímica, y por tanto, los resultados son altamente indicativos de la actividad electroquímica.

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de SECCM voltamperométrica para obtener información localizada del comportamiento de los SPCEs. La técnica SECCM permite realizar medidas con una alta resolución espacial y en una superficie esencialmente nueva para cada medida. La [Figura 3.1b](#) muestra una CV típica para la reducción de 250  $\mu\text{M}$  de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en un SPCE usando SECCM a una velocidad de barrido de 100  $\text{mV s}^{-1}$ . En este caso, se obtiene una CV con respuesta de estado estacionario, que indica una difusión radial de las especies desde la sonda hasta la superficie del electrodo<sup>203</sup>, poniendo de manifiesto un transporte de masa mucho más eficaz que en la macroescala. La actividad electroquímica localizada puede ser representada por medio de mapas de actividad de diferentes tipos. Por ejemplo, la [Figura 3.2a](#) muestra la diferencia de potenciales de pico (calculada como  $\Delta E_p = E_{3/4} - E_{1/4}$ ) a lo largo de toda la superficie escaneada. En la mayoría de las zonas, la  $\Delta E_p$  se encuentra entre 62-75 mV, un valor relativamente cercano al valor teórico de 59 mV, y coincidente con los experimentos en la macroescala. La pequeña diferencia en la  $\Delta E_p$  a lo largo de toda la superficie escaneada revela que la transferencia electrónica es rápida y bastante uniforme. El residuo dejado por el contacto de la sonda sirve como marcador para el análisis estructural con otras técnicas microscópicas con el objetivo de correlacionar específicamente la actividad electroquímica con la información estructural de la superficie electródica. Se registraron imágenes de SEM y mapas Raman en las mismas zonas barridas por SECCM y se encontró una heterogeneidad estructural significativa a lo largo de la superficie. Por ejemplo, las imágenes de SEM ([Figura 3.2c](#)) muestran diferentes grados de rugosidad en toda la superficie, que es típico de una alta temperatura de curado usada para sustratos cerámicos (como son los electrodos utilizados en este trabajo). Dos espectros Raman típicos de los obtenidos tras el análisis de la superficie electródica se muestran en la [Figura 3.3](#). La [Figura 3.2d](#) muestra un mapa representando la relación entre la intensidad de las bandas G/D (bandas a  $\sim 1590$  y  $\sim 1360 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente). Esta relación ha sido previamente utilizada para obtener información sobre la cristalinidad y densidad de defectos de la microestructura del grafito ya que la banda G es indicativa de carbono  $\text{sp}^2$  de alta calidad, y la banda D es indicativa de carbono  $\text{sp}^3$  y puede atribuirse a la presencia de defectos y *step edges*<sup>224,225</sup>. El mapa obtenido mediante Raman coincide, de manera general, con la estructura observada en las imágenes de SEM. El mapa muestra zonas con diferentes relaciones G/D que corresponden a diferentes microestructuras del grafito. Un mayor valor de esta relación G/D sugiere que el grafito presenta más cristalinidad y menor densidad de defectos. Sin embargo, la heterogeneidad estructural de la superficie serigrafiada de grafito no muestra ninguna

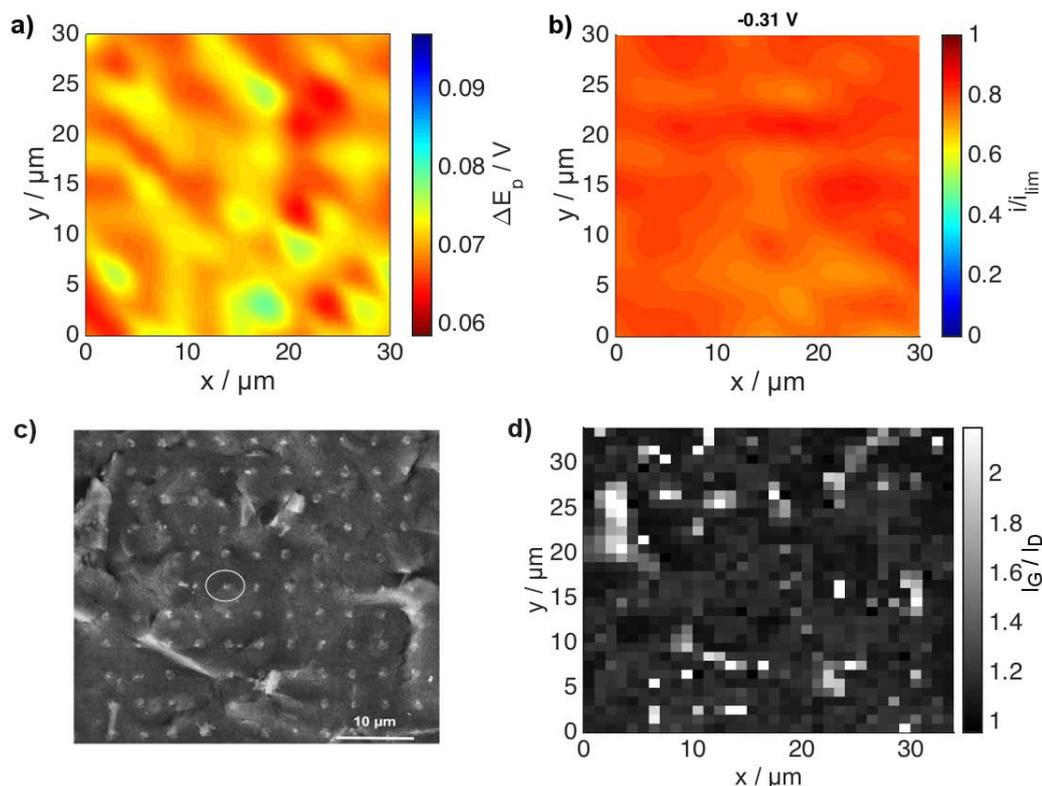


Figura 3.2: Mapa que representa la diferencia de potenciales de pico (como  $|E_{3/4} - E_{1/2}|$ ) (a), mapa que representa la relación entre la corriente y la corriente límite para la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  a  $-0.31$  V (b), imagen SEM de la misma zona (c) y mapa Raman de la relación entre  $I_G/I_D$  para la zona escaneada (d).

correlación con la cinética de la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ . Por otro lado, las excelentes propiedades de la SECCM voltamperométrica permiten construir una serie de mapas equipotenciales de la actividad electroquímica como función de la posición espacial. Las series equipotenciales pueden unirse para generar un video dinámico de la actividad electroquímica (ver en [urlhttps://goo.gl/NWDg7v](https://goo.gl/NWDg7v)) que representa la corriente normalizada ( $i/i_{\text{lim}}$ ) obtenida en un barrido cíclico de potenciales para la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs. Un frame de este video a un potencial al cual se produce la reducción de la especie ( $-0.31$  V) se representa en la [Figura 3.2b](#). Tanto en el mapa dinámico como en este frame específico no se observa una diferencia significativa en la actividad electroquímica de las diferentes zonas de la superficie, indicando que la transferencia electrónica es igual de rápida en toda la superficie para la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ .

Algunos estudios previos publicados en la literatura propusieron que la cantidad de aglutinante puede jugar un papel importante en la respuesta electroquímica del  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs<sup>29,226</sup>. Sin embargo, con medidas en la macroescala, esta información es caracte-

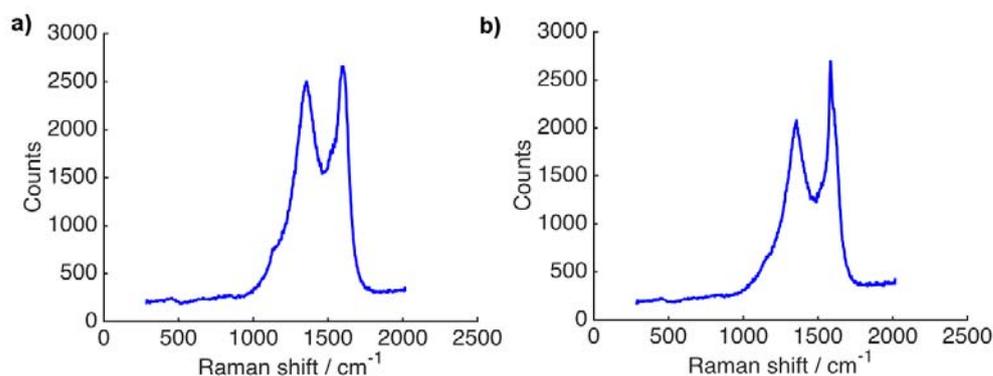


Figura 3.3: Espectros de Raman representativos de la superficie de electrodos serigrafiados de carbono.

rística de la superficie electródica en promedio para diferentes cantidades de aglutinante. Con los resultados obtenidos por SECCM, parece claro que la cantidad de aglutinante es bastante homogénea a lo largo de la superficie ya que no existe diferencia significativa en la actividad electroquímica en diferentes zonas. Por otro lado, varios autores han descrito que la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs es claramente dependiente de la población de defectos similares a *step edges*<sup>227,29</sup>, aunque recientemente se ha descubierto que los planos basales también muestran una cinética rápida para la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ <sup>206</sup>. Los mapas Raman de los SPCEs exhiben algunas zonas donde la relación entre las intensidades de las bandas G y D fueron diferentes, que indica que diferentes zonas tienen diferentes densidades de defectos en la microestructura del grafito. Sin embargo, la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  no mostró ninguna correlación con la diferente microestructura del grafito ya que se observa una respuesta bastante homogénea. Este hecho sugiere que la diferente densidad de defectos del grafito no parece tener un efecto importante en la reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs, siendo un proceso electroquímico bastante insensible a la estructura superficial en estos electrodos, como se espera teóricamente para una transferencia electrónica de esfera externa.

### 3.3 ELECTROQUÍMICA DE LA DOPAMINA EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

El estudio de la electro-oxidación de DA puede mostrar una mayor heterogeneidad en diferentes tipos de superficies ya que la DA experimenta una transferencia electrónica de esfera interna, que, normalmente, depende de la microestructura de carbono<sup>228,229</sup>. Ade-

más, la DA tiene una alta importancia biológica y su determinación es un problema de estudio recurrente<sup>230,231</sup>. La electro-oxidación de DA es un proceso bastante complejo ya que involucra diferentes especies, la adsorción puede jugar un papel importante<sup>232,233</sup> y eventualmente, se podría formar un compuesto polimérico en la superficie electródica que inhibiría la transferencia electrónica<sup>229,234</sup>. Una breve descripción de este proceso a pH fisiológico se describe a continuación y el esquema del mecanismo se muestra en la [Figura 3.4](#). Este proceso sigue un mecanismo ECE (electroquímico-químico-electroquímico) que consiste en la oxidación de la DA para generar dopaminaquinona (DAQ), que tras una reacción acoplada de ciclación intramolecular genera leucodopaminacromo (LDAC), especie fácilmente oxidable a dopaminacromo (DAC). Aunque el proceso de polimerización desde estos compuestos no está ciertamente claro, finalmente, polímeros derivados de melanina son producidos en la superficie electródica<sup>235</sup>. La actividad electroquímica de la oxidación de DA ha sido estudiada en diferentes electrodos serigrafiados, pero, normalmente, se utiliza una concentración fija<sup>30,236,237</sup>. La formación del polímero en la superficie electródica depende de varios factores como la concentración inicial de DA o la velocidad de barrido de la CV<sup>235</sup>. Por tanto, en algunos de estos trabajos donde se estudia la actividad electroquímica con altas concentraciones de DA, el bloqueo de la superficie puede estar afectando a los resultados obtenidos. Por estas razones, en este trabajo se estudió la oxidación de DA a diferentes concentraciones y velocidades de barrido con el objetivo de obtener información del efecto del bloqueo en la superficie serigrafiada y poder extraer la información cinética en condiciones donde el bloqueo es minimizado.

En primer lugar, se estudió la electro-oxidación de DA en la macroescala. Se registraron cinco CVs consecutivas para diferentes concentraciones de DA (30, 500  $\mu\text{M}$ ) y velocidades de barrido (100, 500  $\text{mV s}^{-1}$ ). La [Figura 3.5](#) y la [Figura 3.6a-b](#) muestran las CVs típicas para estas concentraciones y velocidades de barrido. El comportamiento de la DA en SP-CEs es similar a otros electrodos de carbono o metálicos<sup>235</sup>. El voltamperograma muestra un proceso de oxidación con un potencial de pico hacia 0.20 V para la oxidación de DA a DAQ, y su correspondiente reducción a 0 V. Como se ha mencionado antes, la DAQ puede reaccionar químicamente para formar LDAC, así que en la mayoría de los casos, no toda la DAQ generada está disponible para la reducción, como sugiere la relación entre las corrientes del pico anódico y catódico, con un valor menor de uno. La LDAC, generada químicamente, se oxida a un potencial cercano a -0.2 V, y por tanto, se genera DAC, incluso en el primer barrido. La DAC se reduce a un potencial cercano a -0.4 V para formar de nuevo LDAC. Con las CVs consecutivas, la intensidad de los procesos DAC/LDAC se

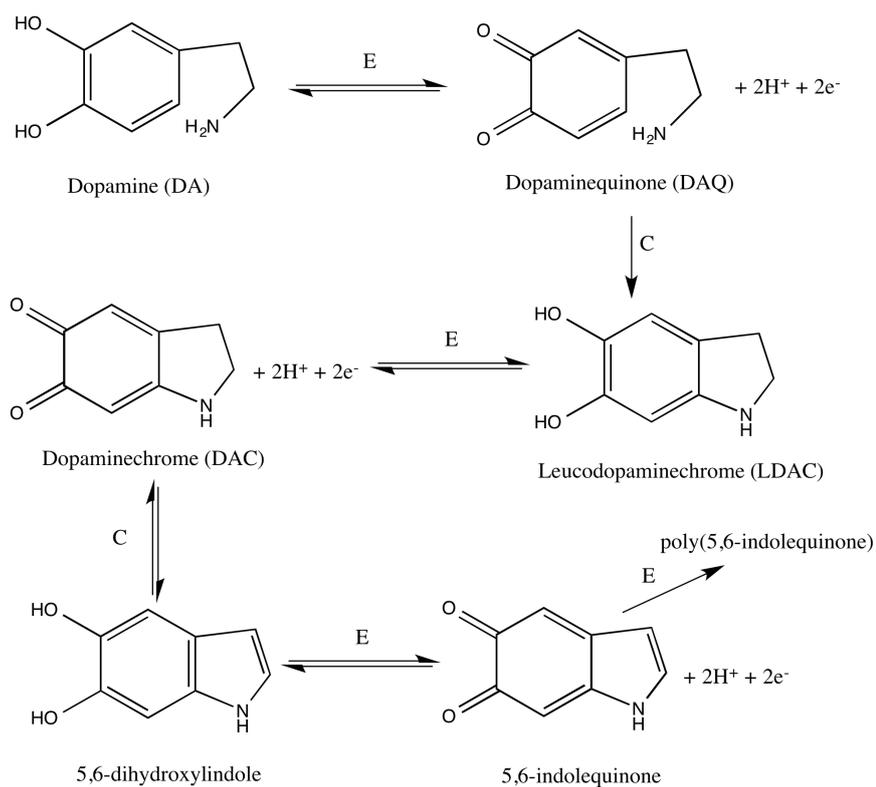


Figura 3.4: Esquema del posible mecanismo de polimerización de dopamina tras su electro-oxidación.

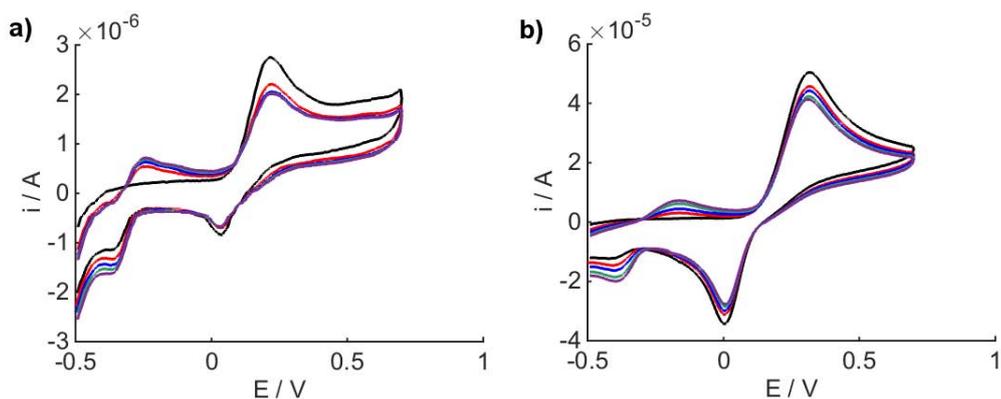


Figura 3.5: Voltamperogramas cíclicos de dopamina en la macroescala a diferentes condiciones: a) 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\text{mV/s}$  y b) 500  $\mu\text{M}$  y 500  $\text{mV s}^{-1}$ .

incrementan ya que más DAQ se está produciendo por la oxidación de DA. Aunque los procesos redox DAC/LDAC están relacionados con la oxidación de DA, en los estudios posteriores se utilizó la oxidación de DA a DAQ para explicar el comportamiento electroquímico en los SPCEs ya que es el proceso típicamente utilizado. Al analizar las medidas consecutivas, se observa un efecto negativo con el aumento del número de CVs, especialmente en las corrientes de pico. La corriente de pico de la quinta CV decrece entre 5-35 % en comparación a la primera CV para las diferentes condiciones. Las medidas voltamperométricas en la macroescala sugieren que la oxidación de DA conduce a un bloqueo rápido del electrodo serigrafiado. Este hecho concuerda con la relación entre las corrientes de pico, que indica que parte de la DAQ ha reaccionado para formar los productos iniciales de la polimerización. Este efecto depende de la concentración de DA y de la velocidad de barrido, mostrando un mayor efecto a velocidades de barrido bajas y altas concentraciones. De hecho, el menor efecto se obtiene con una concentración de 30  $\mu\text{M}$  y una velocidad de barrido de 500  $\text{mV s}^{-1}$ , para las cuales se obtiene una relación cercana a uno entre las corrientes de pico anódica y catódica. Estas condiciones conducen a una formación y acumulación de los productos bloqueantes más lenta, y deberían ser adoptadas cuando se utiliza la oxidación de DA para estudiar el comportamiento de diferentes electrodos de carbono. Con unas condiciones de bloqueo mayores (mayor concentración de DA o velocidades de barrido más bajas), la menor actividad electroquímica podría ser debida, en parte, a la presencia de las especies bloqueantes y no, directamente, relacionadas con la actividad real del electrodo.

Para estudiar el efecto de la heterogénea superficie serigrafiada en la oxidación de DA, los experimentos SECCM voltamperométricos fueron llevados a cabo a diferentes concen-

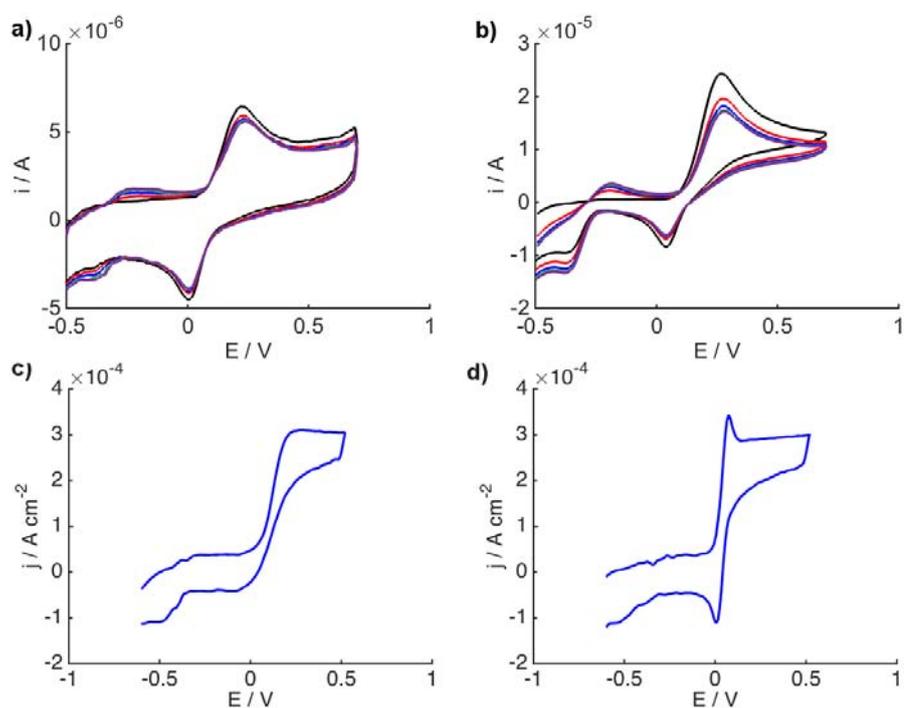


Figura 3.6: Voltamperogramas cíclicos consecutivos en la macroescala para la oxidación de  $30 \mu\text{M}$  de DA a  $500 \text{ mV s}^{-1}$  (a) y  $500 \mu\text{M}$  de DA a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (b). Dos voltamperogramas cíclicos típicos obtenidos con SECCM para la oxidación de  $30 \mu\text{M}$  de DA a  $500 \text{ mV s}^{-1}$  (c-d). El área específica donde estos voltamperogramas son obtenidos se indican en la [Figura 3.8](#).

traciones y velocidades de barrido. Un mapa topográfico puede ser obtenido utilizando los valores de la posición Z de cada contacto de la sonda con la superficie electródica, y como se muestra en la [Figura 3.7](#), coincide relativamente bien con la superficie electródica real, demostrando la versatilidad de la SECCM en *hopping-mode* para el *imaging* de superficies muy rugosas. Según los datos obtenidos en la macroescala, se esperaba que los experimentos usando una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de DA y una velocidad de barrido de 500  $\text{mV s}^{-1}$  condujeran a un bloqueo superficial mínimo y los resultados pudieran ser relacionados completamente con la actividad electroquímica del electrodo frente a la oxidación de DA. En la [Figura 3.6c-d](#), se muestran dos CVs típicas obtenidas en las medidas con SECCM bajo estas condiciones. Aunque la mayoría de los voltamperogramas tienen forma de curva de estado estacionario ([Figura 3.6c](#)), en algunas zonas específicas de la superficie electródica, los voltamperogramas presentaban un pequeño pico agudo a un potencial justo antes de obtener la corriente de estado estacionario. Este hecho sugiere que parte del producto se adsorbe en ciertas zonas de la superficie, conduciendo a una CV con forma de pre-pico, típico de procesos de adsorción. En la [Figura 3.8a](#) se muestra un mapa representando la relación entre la corriente de pico y la corriente límite para la oxidación de DA con el objetivo de visualizar este efecto sobre toda la superficie escaneada. En la mayoría de las zonas, esta relación es cercana a uno, que indica que no existe un pre-pico antes de la corriente límite y que la reacción está controlada por la transferencia de masa (difusión) de las especies al electrodo. Sin embargo, se observan dos zonas en el mapa en las que esta relación es mucho mayor, sugiriendo que los procesos de adsorción solamente ocurren en estas zonas. Otro mapa interesante que puede ser obtenido con SECCM voltamperométrica es el mapa del potencial de semionda ( $E_{1/2}$ ) a lo largo de toda la superficie ([Figura 3.8b](#)). El valor de  $E_{1/2}$  proporciona información de la facilidad con la que se produce una reacción electroquímica, es decir, información cinética. Se obtuvo un mapa bastante heterogéneo para el  $E_{1/2}$ , con varias zonas con mayor actividad. Algunas de estas zonas corresponden a las zonas de adsorción, pero otras zonas muestran una mayor actividad incluso si se observa un proceso controlado por difusión. Este hecho muestra que no toda la superficie del electrodo serigrafiado responde igual, e, incluso, zonas donde no ocurre adsorción, podrían tener cinética más rápida que otras zonas. Esta heterogeneidad en la actividad electroquímica puede ser observada dinámicamente con un video de la densidad de corriente superficial a diferentes potenciales a lo largo de la superficie escaneada por SECCM (ver en <https://goo.gl/XGaF9K>). La [Figura 3.8c](#) muestra la imagen de SEM del área escaneada tras los experimentos de SECCM. Los residuos salinos son bas-

tante homogéneos en los diferentes sitios, y el diámetro de estos residuos (indicativo de la celda electroquímica) fue utilizado para estimar el área electródica de cada una de las medidas por SECCM. Hay una fuerte correlación entre zonas con una actividad electroquímica alta (ya sea cinética más rápida o adsorción) y zonas dónde partículas más grandes sobresalen de la estructura serigrafiada. Similarmente, zonas con cinética más lenta o sin adsorción, parecen ocurrir, generalmente, en zonas con una estructura superficial más lisa y homogénea. Esta respuesta parece ser coherente con otros trabajos, donde, tras una activación con plasma, mayor cantidad de partículas de grafito aparecían sobre la superficie del electrodo y una cinética más rápida para la oxidación de DA era observada<sup>30,238</sup>. Para estudiar la microestructura del grafito y relacionarlo con la actividad electroquímica, se registraron los mapas Raman para la superficie escaneada. La [Figura 3.8d](#) muestra un mapa representando la relación entre la intensidad de las bandas G/D (bandas a  $\sim 1590$  y  $\sim 1360$   $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). Como se puede observar, existe una clara correlación entre el mapa Raman, la imagen SEM y la actividad electroquímica. De hecho, zonas con mayor actividad electroquímica corresponden a zonas con una relación G/D mayor, indicando que partículas de grafito con menor densidad de defectos son responsables de la respuesta electroquímica más alta. Las zonas dónde se observó la adsorción, también mostraron una relación G/D alta. Unos resultados similares se encontraron con experimentos realizados para una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . La influencia de las CVs consecutivas fue estudiada llevando a cabo 5 ciclos en cada zona de un experimento SECCM a velocidades de barrido de  $100$  y  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . La relación entre la corriente de pico del primer ciclo y los siguientes fue cercano a uno ([Figura 3.9](#)), que indica que bajo estas condiciones experimentales el bloqueo de la superficie por la acumulación del polímero no es un problema. Por tanto, los resultados obtenidos en estas condiciones reflejan de manera inequívoca la actividad electroquímica real de los SPCEs.

El proceso de adsorción en los SPCEs fue estudiado con SECCM voltamperométrica usando una disolución de  $1 \mu\text{M}$  de DA a una velocidad de barrido de  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Usando esta concentración tan baja y esta velocidad de barrido, los procesos de adsorción deberían resaltarse en relación a procesos controlados por difusión (por la relación entre la  $i_p$  y la velocidad de barrido). En la [Figura 3.10a](#) se muestran dos CVs típicas obtenidas en este experimento. En algunos casos, se observa un pico definido a un potencial cercano a  $+0.1$  V (potencial similar al pre-pico que aparece para  $30 \mu\text{M}$ ), y un proceso poco definido pero que se puede intuir hacia  $+0.2$  V. En otras zonas de la superficie solamente aparece un proceso con un pico ancho a  $+0.2$  V. Los valores para la corriente de pico anódico (alrededor

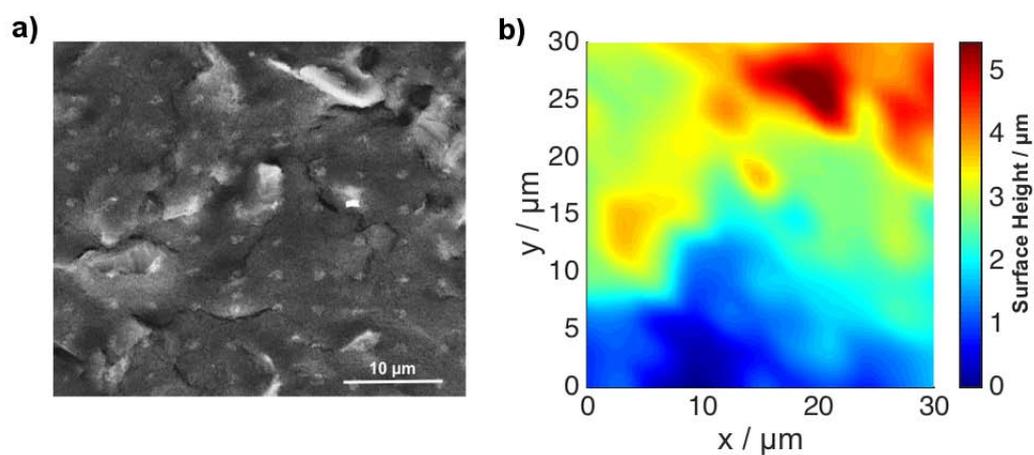


Figura 3.7: Imagen SEM de una zona escaneada de un electrodo serigrafiados y su correspondiente imagen topográfica obtenida con SECCM.

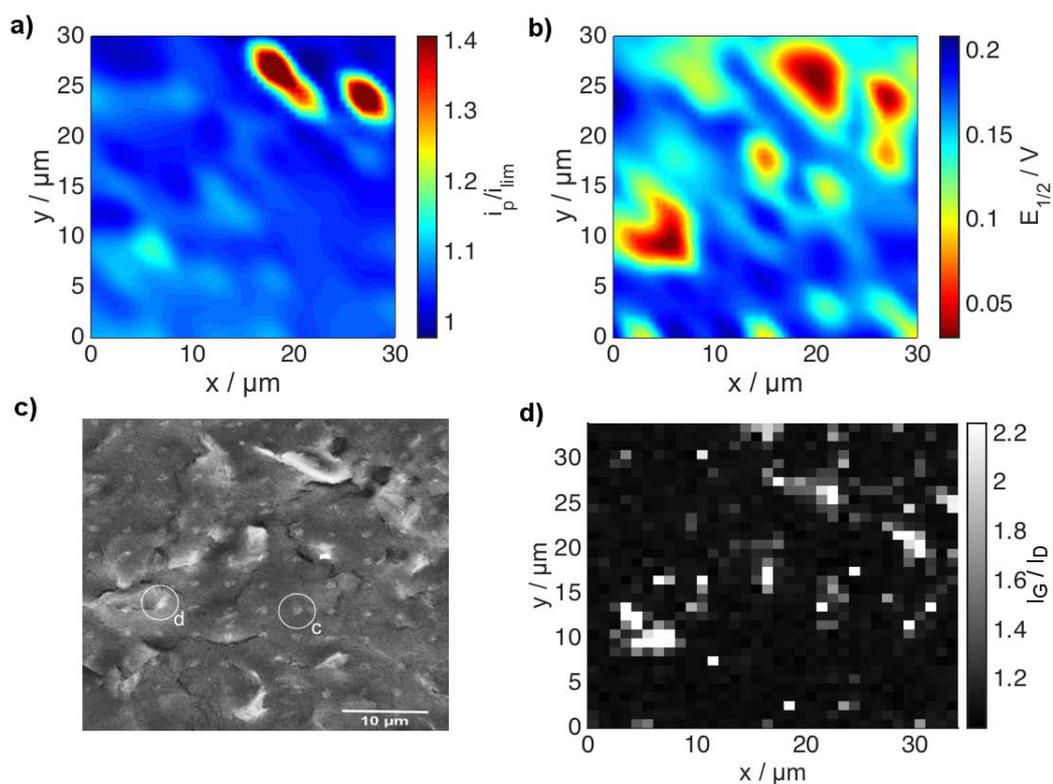


Figura 3.8: Mapas que representan la oxidación de 30  $\mu\text{M}$  de DA a 500  $\text{mV s}^{-1}$  en una configuración SECCM: a) relación entre la corriente de pico y la corriente límite, b) potencial de semionda. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación  $I_G/I_D$  para la misma zona escaneada.

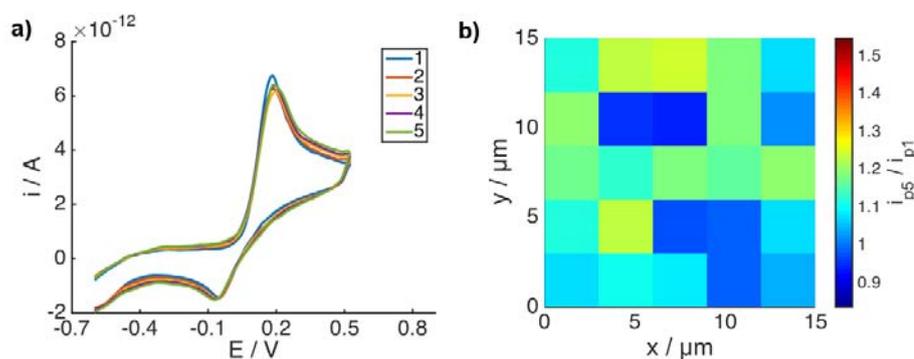


Figura 3.9: a) Voltamperogramas cíclicos consecutivos para un experimento SECCM en una zona específica de la superficie electródica, y b) mapa representando la relación entre la corriente de pico del primer y del quinto voltamperograma.

de  $1 \times 10^{-4} \text{ A cm}^{-2}$ ) son mucho mayores en relación a los obtenidos para concentraciones más altas (por ejemplo, alrededor de  $4 \times 10^{-4} \text{ A cm}^{-2}$  para  $30 \text{ }\mu\text{M}$ ). Este hecho sugiere que una fuerte adsorción ocurre en estas zonas para los experimentos con  $1 \text{ }\mu\text{M}$ , con un efecto importante de la componente difusional en concentraciones más altas. Las corrientes de pico para las zonas dónde se observa el proceso a  $+0.2 \text{ V}$  fue, también, relativamente alta en comparación a las obtenidas para mayores concentraciones, hecho que descarta un proceso controlado por difusión. En este caso, es probable que se produzca una adsorción débil y que la DAQ pueda ser desorbida y formar LDAC, con la consiguiente disminución del proceso de reducción. Para extraer los parámetros de estos procesos ( $i_p$  y  $E_p$ ), se llevó a cabo su deconvolución según se explicó en el [Capítulo 2](#). La carga total bajo el pico voltamperométrico ( $Q_{ads}$ ) puede ser utilizada para obtener una estimación de la concentración superficial adsorbida ( $\Gamma_{ads}$ ) en el electrodo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Q_{ads} = nFA\Gamma_{ads} \quad (3.1)$$

donde  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área electródica. La versatilidad de la SECCM voltamperométrica permite generar un mapa de la concentración superficial a lo largo del área escaneada del electrodo serigrafado ([Figura 3.10b](#)). Aunque varias zonas muestran cierta adsorción del producto, esta especie es, en gran parte, adsorbida en algunas zonas específicas. Analizando las imágenes SEM y el mapa Raman de esta superficie serigrafada ([Figura 3.10c-d](#)), se alcanzan las mismas conclusiones que para las concentraciones altas de DA: zonas con partículas más grandes

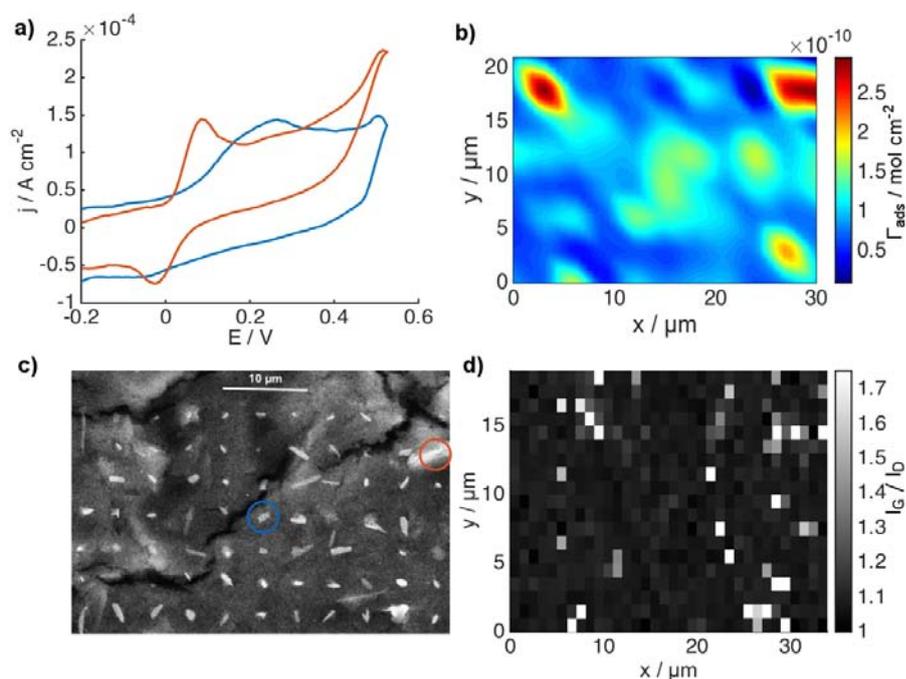


Figura 3.10: a) Dos voltamperogramas típicos obtenidos para la oxidación de  $1 \mu\text{M}$  de DA en configuración SECCM. b) Mapa representando la concentración superficial a lo largo de la superficie serigrafiada. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación  $I_G/I_D$  para la zona barrida. La imagen SEM muestra las zonas específicas de los voltamperogramas en a).

sobresaliendo de la superficie y teniendo un mayor grado de cristalinidad exhiben un mayor grado de adsorción. Es interesante resaltar que en algunos estudios publicados para medidas en la macroescala<sup>89</sup>, la dependencia de la corriente de pico de la oxidación de dopamina con la raíz de la velocidad de barrido parece indicar que el proceso está controlado por difusión. Según los datos obtenidos por SECCM, no toda la superficie sufre procesos de adsorción fuerte sino que es sólo una pequeña parte, por lo que, probablemente, la actividad de las zonas donde la reacción electroquímica están controladas por difusión se superponga y la respuesta global observada viene controlada por las zonas de difusión. Sin embargo, un experimento típico para confirmar la adsorción de las especies es hacer una medida en ausencia de analito tras haber hecho una medida normal. Realizando este experimento tras una medida convencional en SPCEs se puede observar un proceso a un potencial similar a la oxidación de DA, algo que confirma la adsorción sobre la superficie.

Con el objetivo de obtener más información sobre el bloqueo de la superficie por los productos generados en la electro-oxidación de DA, se llevó a cabo SECCM voltamperométrica usando  $500 \mu\text{M}$  de DA. Bajo estas condiciones, incluso en una configuración SECCM,

se obtuvieron voltamperogramas en forma de pico (indicativo de difusión lineal)<sup>2</sup>. En este caso, el mapa representando el  $E_{1/2}$  (Figura 3.11a) muestra una mayor homogeneidad en toda la superficie en comparación a concentraciones menores, pero una fuerte heterogeneidad es observada para el mapa de la  $\Delta E_p$  (Figura 3.11b). Este hecho sugiere que el bloqueo de la superficie podría estar afectando la reducción de DAQ incluso en el primer ciclo, y parece que diferentes zonas de la superficie pueden sufrir un mayor o menor bloqueo. Se espera que en zonas donde el proceso de reducción exhibe una transferencia electrónica disminuida (menores corrientes de pico y potencial desplazado) tendrá un mayor problema de bloqueo. Este proceso de reducción incluso desaparece en muchos de los experimentos a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , ya que existe más tiempo para que se produzca la reacción acoplada, disminuyendo la concentración de DAQ en la interfase electrodo/disolución, y generando las especies iniciales de la polimerización. Mayor cantidad de residuos son observados en las imágenes SEM para los experimentos a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , que confirma el aumento en la generación del polímero sobre la superficie electródica (Figura 3.12). De la misma manera que para concentraciones bajas de DA, se llevaron a cabo estudios estructurales usando SEM y Raman (Figura 3.11c-d). Al comparar el mapa de  $\Delta E_p$  y la imagen SEM, las zonas de la superficie con mayor rugosidad y mayores partículas sobresaliendo parecen ser las zonas más propensas a sufrir el bloqueo de la superficie que zonas más lisas y homogéneas. El mapa Raman también muestra que la relación G/D es mayor en estas zonas indicando un grafito más cristalino con menor densidad de defectos. Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos a bajas concentraciones, ya que estas zonas se caracterizan por tener una mayor actividad electroquímica (y adsorción del producto) que lleva a una mayor reactividad y una generación incrementada de los productos de polimerización, y por tanto, es lógico encontrar un mayor bloqueo de la superficie. En este caso, a estas concentraciones, si alguna adsorción ocurriera en estas zonas, parece que el bloqueo de la superficie sería un proceso más fuerte e impediría el proceso de adsorción, como se muestra por la desaparición del pico de reducción (presente a concentraciones menores cuando una adsorción fuerte era observada). Además, el grafito cristalino con menor densidad de defectos (como se determinó por la relación G/D en Raman), aparece ser más propenso al bloqueo superficial por los productos de oxidación, como se ha visto anteriormente en electrodos de HOPG<sup>229</sup>. La concentración usada en este estudio ( $500 \mu\text{M}$ ) es incluso más baja que las empleadas en diferentes estudios con

<sup>2</sup> Una concentración alta de la especie redox dentro del capilar no permite una transferencia de masa convergente en estas condiciones (aunque podría ocurrir a velocidades de barrido más bajas).

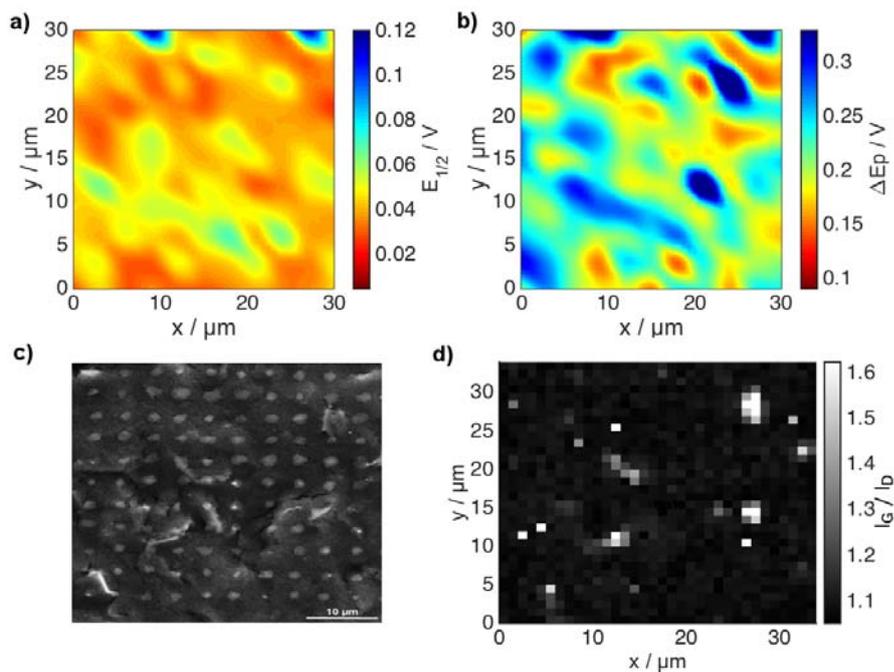


Figura 3.11: Mapa representando el potencial de semionda (a) y la diferencia de potenciales de pico (b) para la oxidación de  $500 \mu\text{M}$  de DA a  $500 \text{ mV s}^{-1}$  en una configuración SECCM. c) Imagen SEM y d) mapa Raman de la relación  $I_G/I_D$  de la zona barrida.

SPCEs, y por tanto, se espera que usando concentraciones más altas, el efecto bloqueante sea mayor, y los resultados se vean más afectados por este proceso.

A continuación, se llevó a cabo SECCM voltamperométrica con CVs consecutivas usando  $500 \mu\text{M}$  y velocidades de barrido de  $100$  y  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Aunque el efecto bloqueante fue significativo para ambas velocidades de barrido, la disminución de corriente fue particularmente alta para  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , con un fuerte desplazamiento del  $E_{1/2}$  (Figura 3.13a), indicando una cinética mucho más lenta (con un cambio dramático en la forma de la onda). Este comportamiento es indicativo de una disminución de la velocidad de la transferencia electrónica según el electrodo experimenta las CVs consecutivas. Interesantemente, en un experimento realizado a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ , el residuo dejado en la superficie del electrodo serigrafiado fue en aumento con los experimentos (Figura 3.13b). Mientras este hecho pudo haber sido debido a una posible interacción del menisco de la sonda con el residuo sólido dejado en la superficie que resultara en un área de contacto mayor, la disminución de la corriente entre el primer y el quinto ciclo muestra la misma tendencia (Figura 3.13c). Esto evidencia, de forma clara y visual, el efecto del bloqueo superficial por los productos de la oxidación de la DA en la respuesta electroquímica. Además, la desaparición por completo del proceso de reducción, indica que incluso en el primer ciclo, la superficie bloqueada

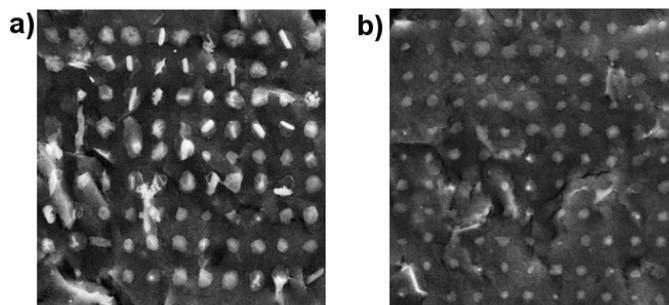


Figura 3.12: Imagen SEM de la zona escaneada en un experimento SECCM para la oxidación de  $500 \mu\text{M}$  de DA a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (a) y de  $500 \text{ mV s}^{-1}$  (b).

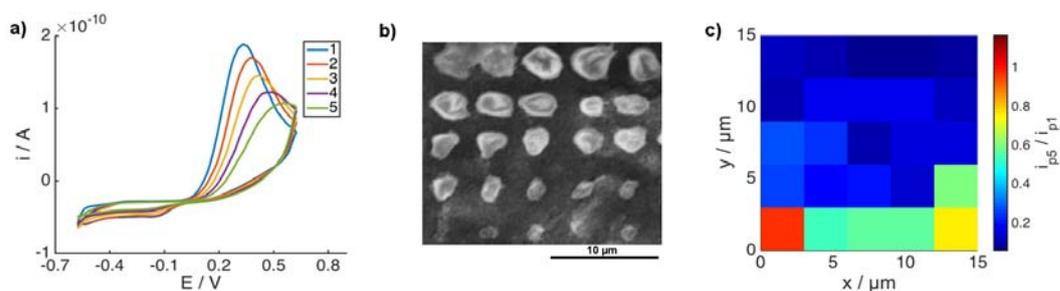


Figura 3.13: a) CVs consecutivas en un experimento SECCM para la oxidación de  $500 \mu\text{M}$  de DA a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . b) Imagen SEM de la zona barrida y c) mapa que representa la disminución de la corriente de pico entre la primera y la quinta CV en la superficie electródica.

afecta de manera significativa a la respuesta electroquímica (cinética, corrientes de pico, potenciales de pico, etc.) incluso a una velocidad de barrido de  $500 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.4 CONCLUSIONES

La SECCM voltamperométrica combinando *imaging* SECCM con medidas de voltamperometría cíclica empleando el *hopping-mode* ha resultado ser una gran técnica para el estudio de superficies muy rugosas y heterogéneas como los electrodos serigrafados. Medidas voltamperométricas ordenadamente espaciadas en la microescala pueden generar una cantidad elevada de información que puede ser representada en forma de mapas y puede ser relacionada con la zona específica de la superficie. Además, la obtención de la respuesta de corriente a diferentes potenciales permite la generación de mapas potenciodinámicos en formato vídeo, capaces de mostrar dinámicamente la actividad electroquímica de la superficie escaneada.

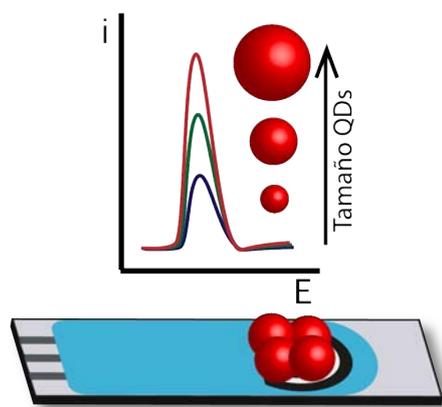
La SECCM voltamperométrica fue utilizada para estudiar la respuesta de electrodos serigrafiados de carbono frente a la reducción de hexaaminrutenio y la oxidación de la dopamina. La reducción de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ocurre de manera bastante homogénea en toda la superficie del electrodo serigrafiado, obteniendo valores de  $\Delta E_p$  cercanos al valor teórico para un sistema reversible. Las características estructurales heterogéneas y la diferente microestructura del grafito no afectaron a la actividad electroquímica. Aunque, previamente, se había descrito que los defectos de tipo *step edge* o la cantidad de aglutinante podían tener una influencia importante en la reducción del  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  en SPCEs, los resultados obtenidos en este capítulo, muestran una fuerte independencia entre la actividad electroquímica de esta especie y la estructura del electrodo serigrafiado. Sin embargo, la oxidación de la dopamina muestra una clara dependencia de la superficie del electrodo serigrafiado, como es de esperar para procesos de transferencia electrónica de esfera interna. Además, por las características complejas de la reacción electroquímica, dependiendo de la concentración utilizada en las medidas, tres aspectos pueden ser estudiados: la cinética, la adsorción o el bloqueo de la superficie por los productos de la reacción. Estos tres aspectos de la actividad electroquímica global dependen de la estructura de los SPCEs. En todos los casos, una mayor actividad se observa en zonas superficiales que tienen partículas de grafito con un mayor grado de cristalinidad (indicado por la relación entre las bandas G/D de los espectros de Raman). Un fuerte efecto del bloqueo de la superficie por los productos de reacción se observa incluso usando concentraciones tan bajas como 500  $\mu\text{M}$ . Por tanto, con el objetivo de estudiar la cinética de la oxidación de dopamina en SPCEs, la elección de la concentración es muy importante, ya que los resultados podrían estar influenciados por el bloqueo superficial incluso a concentraciones, relativamente, bajas.

APLICACIONES  
ELECTROANALÍTICAS DE  
QUANTUM DOTS



# CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE QUANTUM DOTS

---



## 4.1 INTRODUCCIÓN

Los QDs son nanopartículas semiconductoras que están siendo ampliamente utilizadas en la actualidad cuyas propiedades dependen estrechamente de su tamaño. Además, muchas de estas nanopartículas se componen de metales pesados, por lo que pueden tener propiedades tóxicas y contaminantes. Esto conduce a la necesidad de tener un control tanto de sus características (especialmente el tamaño), como de la determinación sensible de concentraciones muy bajas de estas nanopartículas. Normalmente, este tipo de caracterización se realiza de manera rutinaria utilizando espectroscopia UV/Visible, aunque su sensibilidad no es muy alta y puede sufrir de interferencias en disoluciones con especies concomitantes. ICP-MS es una técnica mucho más sensible y que puede utilizarse para este tipo de análisis<sup>220</sup>, aunque por la instrumentación compleja y de mayor coste, el análisis rutinario de estas nanopartículas con esta técnica no resulta adecuado.

El objetivo del trabajo desarrollado en este capítulo fue el desarrollo de una metodología electroquímica para la determinación del tamaño y concentración (en número de par-

tículas) de quantum dots de cadmio. El desarrollo de una metodología utilizando técnicas electroquímicas, que permiten una medida rápida, sensible y barata, utilizando electrodos serigrafiados (bajo volumen de muestra) podría ser importante en el control de estas nanopartículas (ya sea en control de calidad o en estudios toxicológicos) y para complementar a los actuales métodos de rutina. Típicamente, estas nanopartículas son sintetizadas en un medio orgánico, por lo que la metodología desarrollada debería funcionar en este tipo de medio para tener utilidad en fases tempranas de la síntesis. Sin embargo, muchas de las aplicaciones en las que se utilizan necesitan de un medio acuoso, y por tanto, la determinación electroquímica sensible de QDs en medio acuoso podría tener su función para evaluar una posible contaminación. Los QDs utilizados en este trabajo fueron de CdSe en medio orgánico y de CdSe/ZnS en medio acuoso (tras la derivatización con un polímero anfifílico) y se sintetizaron en el laboratorio del grupo de «Espectrometría Analítica» de la Universidad de Oviedo. Tras la síntesis y caracterización espectroscópica de los QDs, se llevó a cabo el diseño y optimización del método electroquímico para la determinación de la concentración de los quantum dots. Este método se basa en la medida electroquímica del Cd(II) liberado del núcleo de los QDs tras un ataque ácido. La plataforma electródica elegida para llevar a cabo esta caracterización fueron electrodos serigrafiados de carbono modificados con una película de bismuto, por su facilidad de uso y su carácter desechable. Históricamente, los electrodos de mercurio o modificados con una película de mercurio han sido los más empleados para la determinación de metales pesados. Estos electrodos poseen una gran capacidad de preconcentración metálica debido a la formación de una amalgama metal-mercurio. Sin embargo, en los últimos años, debido a la alta toxicidad del mercurio, la comunidad científica ha estado buscando alternativas a los electrodos de mercurio, y los electrodos de bismuto surgieron a principios del siglo XXI<sup>239</sup> como una gran plataforma electródica que puede competir en rendimiento con los electrodos de mercurio, y con menor toxicidad. Aunque muy utilizados para aplicaciones analíticas, pocos estudios teóricos se han llevado a cabo para entender su funcionamiento, aunque se conocen algunos datos. El hecho de que sólo se obtenga un pico voltamperométrico para los metales pesados depositados sobre una película de bismuto (en concentraciones traza) indica que se forma una película uniforme entre el metal y el bismuto, debido a la capacidad del bismuto de formar una aleación con estos metales<sup>240</sup>. Por otro lado, el proceso puede seguir tres mecanismos: 1) un mecanismo en el que solamente se produzca la transferencia de masa por difusión de los iones metálicos hacia la superficie electródica, 2) un mecanismo de adsorción, en el que la transferencia de masa se acopla a una

adsorción parcial de los iones metálicos en la película de bismuto, y 3) un mecanismo mixto de adsorción-interacción, en el que además de la difusión y adsorción, ciertas interacciones (atractivas o repulsivas) entre las partículas metálicas acumuladas pueden surgir. Este tercer mecanismo es probablemente el que mejor describa los datos experimentales, mientras que los dos primeros pueden ser casos limitantes (si no existe interacción o adsorción)<sup>240,241</sup>.

Para la caracterización de tamaños, se utilizaron los QDs de CdSe en medio orgánico, ya que el tamaño del núcleo, generalmente, es lo que proporciona las diferentes propiedades ópticas de las nanopartículas. Se utilizó la misma estrategia que para la determinación de la concentración. Como se explicó en la introducción, las técnicas voltamperométricas pueden proporcionar información sobre el *bandgap* entre niveles energéticos, y por tanto, del tamaño del núcleo, pero los defectos estructurales tienen un fuerte efecto en estos resultados. Por esa razón, no está muy claro que estas medidas se puedan utilizar para estimar el tamaño de una población homogénea de QDs. La estrategia presentada aquí ha sido más simple: un núcleo de mayor tamaño posee una mayor cantidad de átomos metálicos, y por tanto, tras su disolución, genera una mayor señal electroquímica, estrategia que como se describe a continuación ofrece resultados competentes para la diferenciación de tamaños.

## 4.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 4.2.1 Caracterización espectroscópica de quantum dots

La calidad de los QDs sintetizados fue evaluada registrando los espectros de absorción UV/Vis y de fluorescencia. Las medidas espectrofotométricas de absorción pueden ser utilizadas para estimar el tamaño, concentración y el coeficiente de extinción de los QDs, siguiendo la estrategia propuesta por Peng y colaboradores<sup>242</sup>. Este método se describe brevemente en el [Capítulo 2](#). Adicionalmente, la anchura a la mitad de la altura (fwhm) de la emisión fluorescente es un parámetro normalmente empleado para estimar la distribución de tamaño de las nanopartículas (se considera que valores de fwhm menores de 35-40 nm indican una baja dispersión de tamaños). Se llevó a cabo cuatro diferentes síntesis de QDs de CdSe, variando los tiempos de reacción y la concentración de los precursores para obtener QDs con diferente tamaño de nanopartícula, como se describió en el [Capítulo 2](#). El tamaño del núcleo, la concentración en partículas (ambos calculados según las ecuaciones

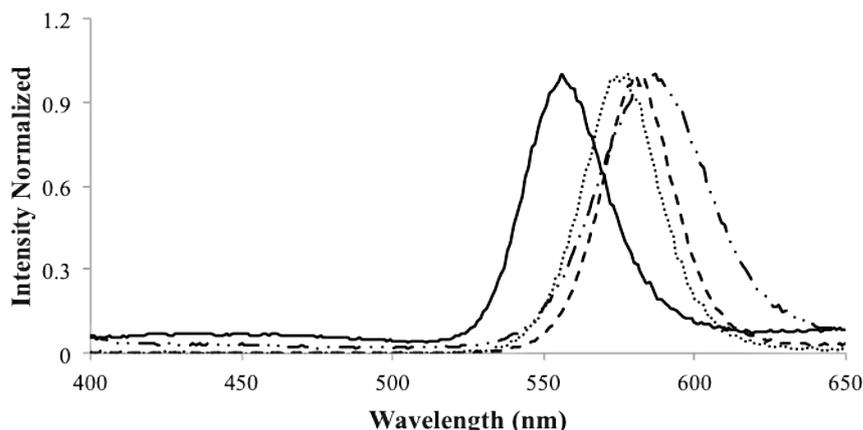


Figura 4.1: Espectro de emisión de fluorescencia en  $\text{CHCl}_3$  para los diferentes quantum dots CdSe sintetizados (ver [Tabla 4.1](#)). Síntesis 1, línea continua; Síntesis 2, línea de puntos; Síntesis 3, línea discontinua; Síntesis 4, línea de puntos y guiones

| QDs             | Diámetro (nm) | $\lambda_{\text{em. max.}}$ (nm) | Concentración ( $\mu\text{M}$ ) |
|-----------------|---------------|----------------------------------|---------------------------------|
| CdSe síntesis 1 | 2.77          | 555                              | 3.75                            |
| CdSe síntesis 2 | 2.98          | 575                              | 2.65                            |
| CdSe síntesis 3 | 3.14          | 580                              | 5.51                            |
| CdSe síntesis 4 | 3.26          | 590                              | 4.11                            |
| CdSe/ZnS        | 3.26          | 590                              | 1.61                            |

Tabla 4.1: Diámetro, concentración y longitud de onda del máximo de emisión de los quantum dots sintetizados de CdSe y CdSe/ZnS.

de Peng) y la longitud de onda del máximo de emisión de los QDs de CdSe obtenidos tras las diferentes síntesis se muestran en la [Tabla 4.1](#). La [Figura 4.1](#) muestra el espectro de emisión de fluorescencia para las diferentes síntesis en medio orgánico. Como se puede observar, todas las síntesis orgánicas de QDs de CdSe muestran una banda intensa de emisión fluorescente y una fwhm de alrededor de 30 nm, indicando una baja dispersión del tamaño de los QDs. El espectro de fluorescencia para una síntesis diferente de QDs de CdSe/ZnS en medio acuoso se representa en la [Figura 4.2](#). De nuevo, el espectro obtenido con una banda de emisión estrecha indica la buena distribución de tamaños de las nanopartículas sintetizadas. El tamaño del núcleo, la concentración en partículas (ambos calculados según las ecuaciones de Peng) y la longitud de onda del máximo de emisión para este tipo de QDs vienen también indicados en la [Tabla 4.1](#).

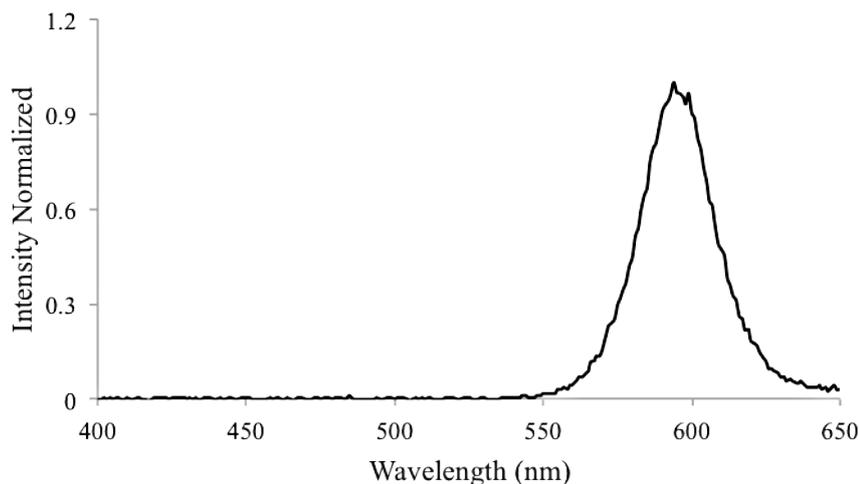


Figura 4.2: Espectro de emisión de fluorescencia de los quantum dots de CdSe/ZnS en medio acuoso.

#### 4.2.2 Digestión y medidas voltamperométricas de quantum dots

##### *QDs de CdSe en medio orgánico*

Un ataque ácido de los QDs suele ser necesario para liberar una gran cantidad de iones de Cd que serán posteriormente determinados por voltamperometría. Típicamente, 10  $\mu\text{L}$  de QDs en  $\text{CHCl}_3$  se añadieron a un tubo eppendorf y tras la total evaporación del  $\text{CHCl}_3$ , 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4$  1 M fue añadido para disolver los QDs. Como se ha descrito previamente en la literatura, un ácido concentrado es capaz de disolver QDs de Cd. Por tanto, se podría asumir que el ataque de QDs de CdSe con ácido concentrado es probable que siga una reacción similar al CdSe en la macroescala:



Tras agitar ligeramente para asegurar un ataque ácido eficiente, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M para neutralizar el exceso de ácido. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora de acetato 0.1 M pH 5.0 con 1.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Bi(III) y se mezcló con la disolución previa. Una alícuota de 40  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante fue depositada sobre el electrodo. Se aplicó un potencial constante de +0.40 V durante 60 s para activar el electrodo de trabajo y se aplicó un potencial de deposición de -1.30 V durante 120 s

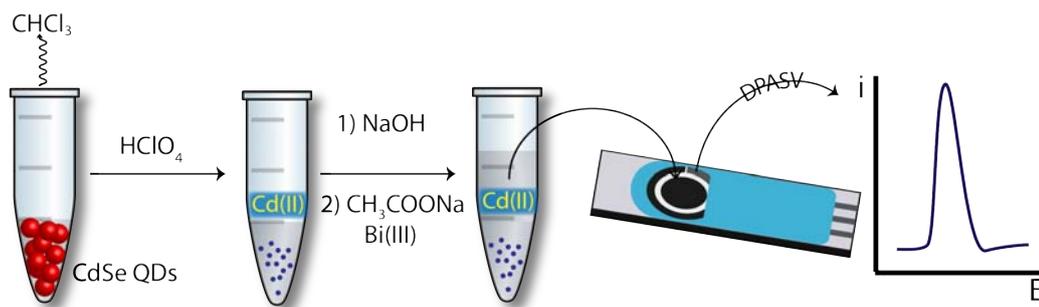


Figura 4.3: Esquema del procedimiento de medida para los QDs de CdSe en medio orgánico.

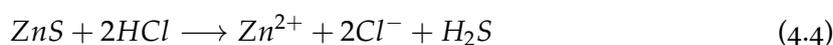
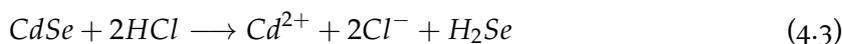
(200 s para medidas de concentración) con el objetivo de causar la reducción de Cd(II) y la preconcentración de Cd(0) sobre la superficie electroda según la ecuación:



Usando voltamperometría de pulso diferencial (DPV) se hizo un barrido de potenciales desde -1.30 V a -0.80 V, produciendo la reoxidación (redisolución) del Cd(0) a Cd(II) que genera una corriente eléctrica. Un esquema de este procedimiento se muestra en la Figura 4.3.

#### QDs de CdSe/ZnS en medio acuoso

Típicamente, 10  $\mu\text{L}$  de una dispersión acuosa de QDs se añadieron sobre el electrodo de trabajo de un SPCE. 1  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M fue añadido sobre la disolución anterior para disolver los QDs mediante un ataque ácido. De manera similar al caso de los QDs de CdSe, para los QDs de CdSe/ZnS se espera que el ataque ácido resulte en las reacciones descritas en las siguientes ecuaciones:



A continuación, 30  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora de acetato 0.1 M pH 4.5 con 1.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Bi(III) fueron añadidos sobre el electrodo recubriendo toda la celda electroquímica. Un potencial constante de +0.40 V durante 60 s se aplicó para activar la superficie electroda y un potencial de deposición de -1.10 V durante 200 s se aplicó para la pre-

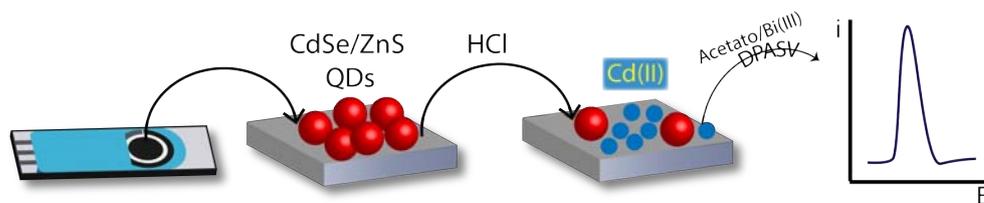


Figura 4.4: Esquema del procedimiento de medida para los QDs core-shell de CdSe/ZnS en medio acuoso.

concentración metálica. Una reacción electroquímica idéntica ocurre en este caso como en el caso de los CdSe para la preconcentración del cadmio sobre la superficie electródica. Se aplicó un barrido de potenciales desde  $-1.10$  V hasta  $-0.80$  V usando DPV para producir la redisolución del Cd(o) a Cd(II) con los parámetros optimizados que se describen a continuación. Un esquema de este procedimiento se muestra en la [Figura 4.4](#).

#### 4.3 OPTIMIZACIÓN DE ELECTRODOS SERIGRAFIADOS MODIFICADOS CON BISMUTO PARA LA DETECCIÓN DE Cd(II)

Para la caracterización electroquímica de los QDs fue esencial elegir una plataforma electroquímica adecuada para la detección de Cd(II). Electrodo serigrafado de carbono modificados con una película de bismuto fueron elegidos para la detección de este metal, como se ha descrito anteriormente en la literatura<sup>243,244</sup>. La técnica de referencia en estos trabajos es la voltamperometría de redisolución anódica, por su sencillez y sensibilidad. La deposición de Cd en el electrodo se lleva a cabo utilizando una película de bismuto que mejora la preconcentración. En la [Figura 4.5](#) se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para una disolución de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Cd (II) y de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Bi(III) en acetato  $0.1$  M pH 4.5. Los procesos de reducción se asignan de manera relativamente fácil y en orden hacia potenciales negativos, la reducción de bismuto y la reducción de cadmio. Se puede observar un proceso en el blanco, que se asigna a la ORR, pero que parece estar minimizado cuando las especies metálicas se reducen sobre el electrodo. En la misma figura, se representa una curva DPV para  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II) en presencia y ausencia de  $10 \text{mg L}^{-1}$  de Bi(III), donde se observa claramente la mejora en la preconcentración (y posterior redisolución) obtenida con la película de bismuto en SPCEs. La optimización de la película de bismuto es crítica para conseguir un método lo más sensible posible. Por esta razón, se llevó a cabo la evaluación de diferentes condiciones con un efecto en

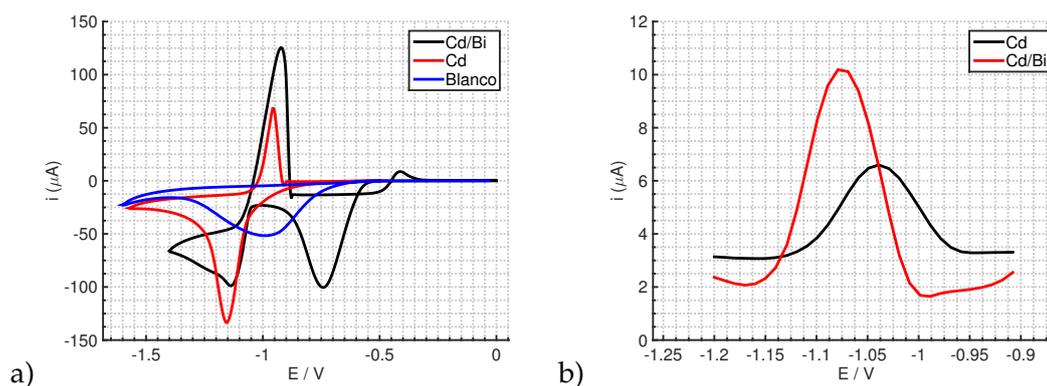


Figura 4.5: a) CV de una disolución de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd(II) en presencia y ausencia de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Bi(III), además de una disolución en ausencia de metales. b) DPV de una disolución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II) en presencia y ausencia de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Bi(III) y DPV de Cd y Bi

la película de bismuto. Inicialmente, se estudió la generación de la película de bismuto por electrodeposición sobre SPCE mediante estrategias *in situ* y *ex situ*, ya conocidas en la literatura<sup>245,246</sup>. Diferentes concentraciones de bismuto fueron evaluadas para ambas metodologías y varios potenciales y tiempos de deposición para la metodología *ex situ* (Figura 4.6). La generación *in situ* de la película de bismuto, con una concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Bi(III), fueron las condiciones utilizadas para la detección electroquímica de cadmio. Por otro lado, ciertos autores han descrito una mejora en la magnitud y reproducibilidad de la señal voltamperométrica de Cd(II) usando este tipo de electrodos tras una activación de la superficie electródica mediante la aplicación de un potencial positivo. Varios potenciales y tiempos de activación fueron evaluados, eligiéndose la aplicación de un potencial de  $+0.4 \text{ V}$  durante  $30 \text{ s}$  (Figura 4.6), justo antes de realizar la preconcentración metálica sobre la superficie electródica. Se utilizó voltamperometría de pulso diferencial como la técnica más adecuada por ofrecer una mejor reproducibilidad en la medida electroquímica de Cd(II) en comparación con voltamperometría de onda cuadrada.

#### 4.3.1 Caracterización de la superficie electródica

La caracterización de la superficie electródica optimizada (película de bismuto sobre SPCEs) se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Sin embargo, no se observó un cambio visible en la superficie tras la deposición de la película (ya fuera mediante la estrategia *in situ* o *ex situ*), como se ilustra en la Figura 4.7. Este hecho podría

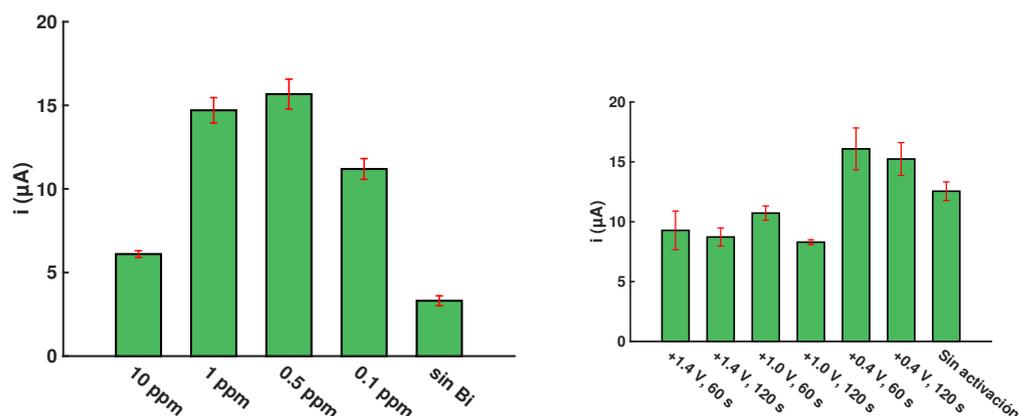


Figura 4.6: a) Efecto de la concentración de Bi(III) en la corriente de pico DPV para una disolución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II), y b) efecto de un potencial de activación justo antes de realizar la medida.

deberse a que la cantidad y tamaño de las partículas de bismuto depositadas fueron muy pequeñas (posiblemente menores de 20 nm) y no son visibles con la resolución que posee el SEM en una superficie tan heterogénea y rugosa como es la superficie de un electrodo serigrafiado. No obstante, la presencia de bismuto se confirma por el característico pico voltamperométrico del bismuto. Se llevaron a cabo medidas coulombimétricas (por cronamperometría) para determinar la carga generada en la reoxidación metálica de manera que se puede estimar la cantidad depositada de bismuto y los resultados para diferentes concentraciones y las diferentes estrategias de deposición se muestran en la [Tabla 4.2](#). Tras la etapa de deposición (aplicando  $-1.2 \text{ V}$  durante 120 s), para la estrategia de deposición *ex situ*, se aplicó un salto de potencial desde el potencial de deposición hasta  $-0.2 \text{ V}$  para llevar a cabo la oxidación del bismuto, mientras que para la deposición *in situ* (cuya disolución contenía también  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II)), se aplicó en primer lugar un potencial desde el potencial de deposición hasta  $-0.7 \text{ V}$  durante 60 s con el objetivo de oxidar selectivamente el Cd depositado, y a continuación, se aplicó un salto de potencial hasta  $-0.2 \text{ V}$  para llevar a cabo la oxidación del Bi. Medidas del blanco, en ausencia Cd y Bi, fueron llevadas a cabo para estimar la carga en ausencia de las especies (carga capacitiva). Se determinó la carga bajo la curva  $i-t$  para estimar la cantidad de metal depositado según las leyes de Faraday (descritas en el apéndice), y la ecuación 4.5, donde  $m$  es la masa de la especie depositada,  $Q$  es la carga eléctrica generada (o consumida) en el proceso,  $F$  es la constante de Faraday,  $M$  es la masa molar de la sustancia y  $n$  es el número de electrones intercambiados. Como se puede observar la cantidad de Bi depositada con la metodología

|                | [Bi(III)] ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bi (ng)         |
|----------------|-------------------------------------|-----------------|
| <b>In situ</b> | 0.1                                 | $0.2 \pm 0.1$   |
|                | 0.5                                 | $2.8 \pm 0.1$   |
|                | 1                                   | $4.8 \pm 0.5$   |
| <b>Ex situ</b> | 10                                  | $9.8 \pm 0.9$   |
|                | 0.5                                 | $0.41 \pm 0.04$ |
|                | 10                                  | $1.7 \pm 0.3$   |

Tabla 4.2: Cantidad de bismuto depositada en la superficie electródica para diferentes condiciones de deposición.

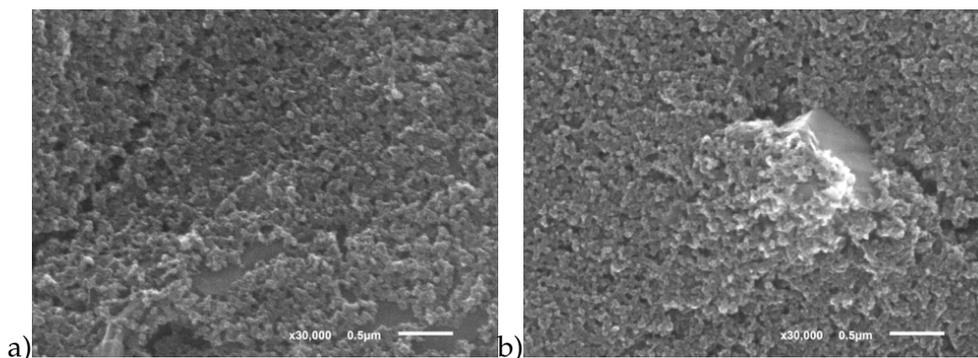


Figura 4.7: Imagen SEM del electrodo de trabajo serigrafiado antes (a) y después (b) de la etapa de deposición.

*in situ* es mucho mayor para las mismas condiciones que para la metodología *ex situ*. Esta puede ser una de las razones por las que a igualdad de condiciones se obtenga una mayor respuesta del cadmio con la formación simultánea de la película de bismuto, aunque otros factores podrían también ser responsables.

$$m = \frac{QM}{nF} \quad (4.5)$$

#### 4.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETECCIÓN DE QUANTUM DOTS

##### 4.4.1 *Quantum dots de CdSe en medio orgánico*

En el procedimiento que se propone para obtener una alta sensibilidad es necesario una digestión ácida de los QDs para liberar Cd(II) en la disolución antes de la detección electroquímica. De esta forma, la sensibilidad se mejora de manera significativa en com-

paración con la detección directa de los QDs sin digestión y, además, se puede obtener información global de la nanopartícula (y no solo de la superficie). Inicialmente, se llevó a cabo un método de digestión simple en la superficie del electrodo tras depositar unos pocos  $\mu\text{L}$  de una dispersión de QDs ( en  $\text{CHCl}_3$ ). Sin embargo, el  $\text{CHCl}_3$  deterioraba la superficie del electrodo y los resultados analíticos obtenidos no fueron reproducibles. Por tanto, se llevó a cabo una metodología alternativa para la digestión de los QDs, que consistió en el ataque ácido de las nanopartículas fuera del electrodo. El protocolo seguido se detalla en la [Figura 4.3](#). El volumen de la dispersión de QDs elegido fue de  $10 \mu\text{L}$  con una concentración de  $100 \text{ nM}$  ya que se encontró que era una concentración lo suficientemente elevada para obtener una señal analítica sensible en el rango de trabajo. Cabe destacar que si una mayor sensibilidad fuera necesaria, el volumen de la dispersión de QDs podría ser mayor y más nanopartículas estarían disponibles para el ataque ácido, tras la evaporación del  $\text{CHCl}_3$ . Diferentes ácidos ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  and  $\text{HClO}_4$ ) y diferentes condiciones experimentales se utilizaron para la optimización de la digestión de los QDs. Los mejores resultados en términos de la relación señal/ruido fueron encontrados para  $\text{HClO}_4$   $1 \text{ M}$  y un volumen de  $10 \mu\text{L}$  (asegurando que todas las nanopartículas estuvieran en contacto con el ácido). Para neutralizar el exceso de ácido, se utilizaron  $10 \mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ M}$ . Esta neutralización fue necesaria porque un medio más ácido podría interferir con la detección electroquímica de  $\text{Cd(II)}$ , ya que la reducción de  $\text{H}^+$  ocurre a un potencial cercano. En un medio más ácido la deposición metálica podría perder eficacia ya que es probable que los  $\text{H}^+$  se adsorban sobre zonas de la superficie y se generen burbujas de  $\text{H}_2$ , según se esquematiza en la [Figura 4.8](#). Aunque recientemente se ha descubierto una metodología para usar electrodos de bismuto en la determinación de metales pesados en un medio ácido<sup>247</sup>, se utilizó una disolución reguladora de acetato de sodio  $0.1 \text{ M}$   $\text{pH}$   $5.0$  para la medida electroquímica ya que el acetato es la reguladora más utilizada para este tipo de aplicaciones. Los diferentes parámetros relacionados con la voltamperometría de redisolución anódica mediante pulso diferencial fueron optimizados: potencial de deposición ( $-1.3 \text{ V}$ ), amplitud ( $0.1 \text{ V}$ ), escalón de potencial ( $6 \text{ mV}$ ), tiempo de pulso ( $8 \text{ ms}$ ) y tiempo de intervalo ( $1.5 \text{ s}$ ). El tiempo de deposición fue elegido en función de la aplicación que se fuera a realizar. En este sentido, un tiempo de deposición de  $200 \text{ s}$  fue seleccionado para la determinación de la concentración de QDs, ya que se prefería un método más sensible, mientras que para los estudios de caracterización de tamaño,  $120 \text{ s}$  fue suficiente para obtener una señal analítica aceptable.

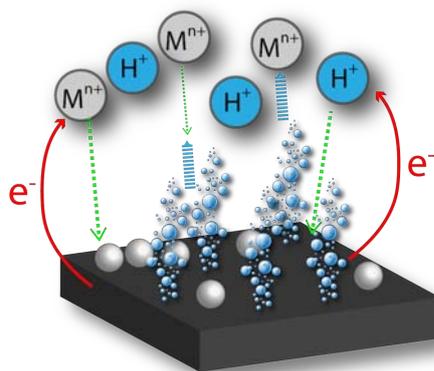


Figura 4.8: Esquema del mecanismo de competición entre la generación de  $H_2$  y la deposición metálica.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Vmuestra</b>         | 1, 2, 5, <b>10</b> , 20 $\mu\text{L}$  |
| <b>Ácido</b>            | HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub> , HClO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HCl/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| <b>[Ácido]</b>          | 0.5, <b>1</b> , 2 M  |
| <b>Vácido</b>           | <b>1</b> , 2, 5, 10 $\mu\text{L}$  |
| <b>pH-acetato</b>       | 4.0, <b>4.5</b> , 5.0  |
| <b>[Acetato]</b>        | <b>0.1</b> , 0.2 M   |
| <b>Tiempo-digestión</b> | <b>0</b> , 5 min   |

Tabla 4.3: Factores optimizados para la detección de QDs en medio acuoso. En negrita los parámetros más adecuados.

#### 4.4.2 Quantum dots de CdSe/ZnS en medio acuoso

Para la caracterización electroquímica de los QDs de CdSe/ZnS (*core-shell*) en medio acuoso se llevó a cabo el procedimiento antes descrito, y se optimizaron diferentes parámetros como el volumen de muestra, el tipo, volumen y concentración de ácido utilizado para la digestión de las nanopartículas y la disolución reguladora en la etapa de detección. En la [Tabla 4.3](#) se enumeran todos los parámetros evaluados (y su magnitud). Los parámetros finales de la metodología son: 10  $\mu\text{L}$  de QDs en Tris 0.1 M pH 7.2, 1  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M y 30  $\mu\text{L}$  de acetato 0.1 M pH 4.5 con 1 ppm de Bi(III). Cabe destacar que la disolución de QDs en este caso podría no ser completa, ya que la relación entre el volumen de muestra y de ácido es 10:1. Sin embargo, esto no afecta a los resultados cuantitativos finales. De hecho, el uso de un mayor volumen o concentración de ácido lleva a una detección menos sensible por la generación de  $H_2$  en la superficie electrodo como se mencionó anteriormente.

## 4.5 DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA CONCENTRACIÓN DE QUANTUM DOTS

4.5.1 *Quantum dots de CdSe en medio orgánico*

La cantidad de Cd(II) liberada tras el ataque ácido es directamente proporcional a la cantidad de QDs en disolución, como ha sido previamente descrito<sup>152</sup>. Para la preparación de una recta de calibrado, una disolución de  $6.0 \times 10^{14}$  QDs mL<sup>-1</sup> (1.0  $\mu$ M), con un tamaño de nanopartícula de 3.26 nm (determinado por técnicas espectroscópicas), fue diluida en CHCl<sub>3</sub> con el fin de preparar un conjunto de disoluciones de diferente concentración de nanopartículas. Estas disoluciones orgánicas diluidas fueron, a continuación, analizadas siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 4.2.2. Como se muestra en la Figura 4.9, el método desarrollado dio lugar a una recta de calibrado con una alta linealidad en un rango entre  $3.0 \times 10^{12}$ - $1.2 \times 10^{14}$  QDs mL<sup>-1</sup> (5 nM - 200 nM) ( $i(\mu\text{A}) = 0.38 \text{ QDs} \cdot \text{mL}^{-1} (\times 10^{12}) + 0.46$ ,  $R^2 = 0.998$ ,  $\text{RSD} = 5.6\%$ ,  $n = 3$ ) y un límite de detección de  $1.6 \times 10^{12}$  QDs mL<sup>-1</sup> (2.6 nM). Considerando el volumen de muestra analizado (10  $\mu$ L), el límite de detección corresponde a sólo  $1.6 \times 10^{10}$  nanopartículas (27 fmol de QDs). Los datos obtenidos muestran una alta relación entre la concentración de QDs de CdSe en disolución y la señal voltamperométrica medida del Cd(II) liberado tras el ataque ácido. Por tanto, este método puede ser aplicado de manera satisfactoria a la determinación de QDs en disolución orgánica. Aunque el límite de detección conseguido es significativamente mayor que para ICP-MS (18 pM), la determinación electroquímica de QDs puede ser muy conveniente en una amplia variedad de aplicaciones debido a la facilidad del procedimiento y un menor coste (en términos de inversión y coste de trabajo) de la instrumentación empleada.

4.5.2 *Quantum dots de CdSe/ZnS en medio acuoso*

De manera similar, la concentración de QDs core-shell de CdSe/ZnS en medio acuoso puede relacionarse con la señal voltamperométrica obtenida tras el ataque ácido. Usando la metodología optimizada descrita en la Sección 4.2.2, se llevó a cabo una recta de calibrado (Figura 4.10). Se obtuvo un rango lineal entre  $6.0 \times 10^{12}$  QDs mL<sup>-1</sup> (10nM) y  $3.0 \times 10^{13}$  QDs mL<sup>-1</sup> (50nM) según la ecuación  $i(\mu\text{A}) = 0.86 \text{ QDs mL}^{-1} (\times 10^{12}) - 0.70$ , ( $R^2 = 0.997$ ,  $\text{RSD} = 8.8\%$ ,  $n = 3$ ) y un límite de detección de  $2.0 \times 10^{12}$  QDs mL<sup>-1</sup> (3.3 nM). Este rango lineal, menor en comparación a la metodología para los QDs de CdSe en medio orgánico, puede ser debido a varias razones como la diferencia entre los volúmenes de ácido y muestra

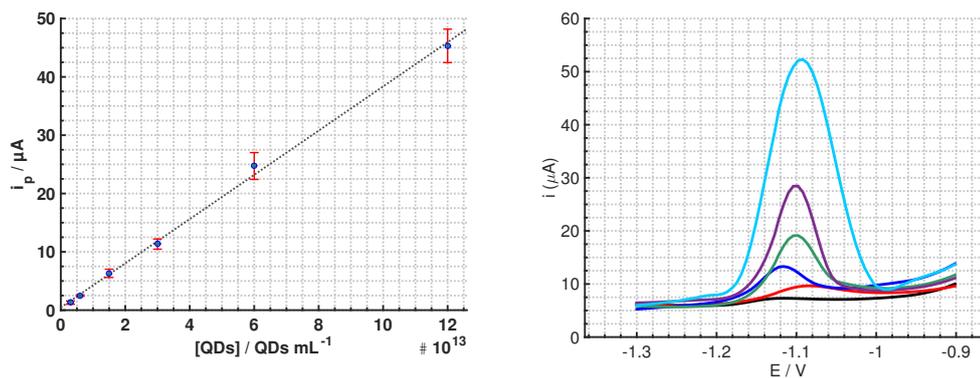


Figura 4.9: Recta de calibrado representando la señal del Cd(II) frente a la concentración de QDs de CdSe en medio orgánico para 3, 6, 15, 30, 60, 120 ( $\times 10^{12}$ ) QDs  $\text{mL}^{-1}$ . (Inset: voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos para estas medidas. Condiciones experimentales descritas en Sección 4.2.2.

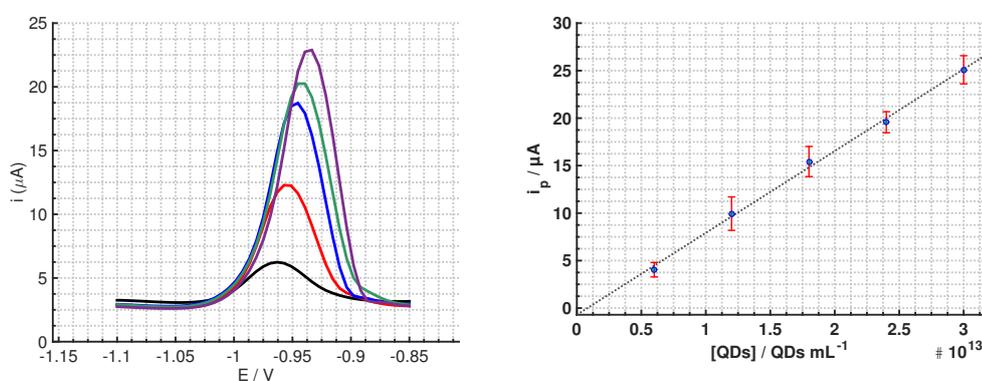


Figura 4.10: Recta de calibrado representando la señal de Cd(II) frente a la concentración de QDs de CdSe/ZnS en medio acuoso para 6, 12, 18, 24, 30 ( $\times 10^{12}$ ) QDs  $\text{mL}^{-1}$ . Inset: voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos para estas medidas. Condiciones experimentales descritas en Sección 4.2.2.

utilizados y a un ataque ácido menos efectivo debido al recubrimiento más complejo de la superficie (los QDs solubles en agua están recubiertos con una capa externa de ZnS y un polímero anfifílico, basado en grupos funcionales de anhídrido polimaleico). Sin embargo, esta metodología es mucho más simple y también permite la determinación de muy bajas concentraciones de QDs *core-shell* en medio acuoso,  $2.0 \times 10^{12}$  QDs  $\text{mL}^{-1}$  (3.3 nM), que, considerando el volumen de muestra analizado (10  $\mu\text{L}$ ), corresponde a la detección de sólo  $2.0 \times 10^{10}$  QDs (37 fmol de QDs). En comparación a trabajos previos llevados a cabo por otros autores, donde la detección de QDs se realiza de manera directa<sup>248</sup> ( $1 \times 10^{14}$  QDs, 0.15 nmol de QDs), se consigue una mejora de más de tres órdenes de magnitud.

## 4.6 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE QUANTUM DOTS

El enfoque seguido para la determinación electroquímica del tamaño de los QDs es muy sencillo. Se basa en que la cantidad de metal en el núcleo de la nanopartícula es proporcional al tamaño de la nanopartícula, y por tanto, si se puede establecer una relación cuantitativa entre una señal electroquímica y la cantidad de metal de los QDs, se podría llevar a cabo la determinación de tamaños. Las modificaciones superficiales de los QDs, típicamente empleadas para su solubilización, incrementar su estabilidad minimizando agregaciones o proporcionarles actividad funcional, pueden incrementar el tamaño total de la nanopartícula y afectar a sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, solamente el diámetro (tamaño) del núcleo de la nanopartícula afecta a sus propiedades optoelectrónicas. Para QDs *core-shell*, algunos átomos de Cd pueden aparecer de manera aleatoria fuera del núcleo de la nanopartícula, evitando la posibilidad de establecer una relación directa entre la cantidad total de Cd y el tamaño del núcleo. Por esta razón, la caracterización del tamaño de los QDs se llevó a cabo solamente con QDs de CdSe en medio orgánico, ya que todo el Cd medido está comprendido en el núcleo y por tanto, puede relacionarse con sus propiedades optoelectrónicas. Disoluciones orgánicas conteniendo QDs de varios tamaños, previamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas (2.77, 2.98, 3.14 y 3.26 nm), fueron utilizadas para la validación de la metodología electroquímica. El tamaño del núcleo de los QDs de CdSe puede relacionarse con la señal voltamperométrica obtenida tras el ataque ácido. Usando el procedimiento experimental previamente optimizado esquematizado en la [Figura 4.3](#), la señal electroquímica característica del Cd(II) fue obtenida. Como era de esperar, se observaron diferencias significantes entre las señales de Cd obtenidas para cada tamaño de nanopartícula. Debe mencionarse que la concentración de la disolución de QDs medida fue siempre la misma para todos los tamaños:  $6.0 \times 10^{13}$  QDs  $\text{mL}^{-1}$  (100 nM de QDs). La [Figura 4.11](#) muestra la alta relación lineal entre el volumen de la nanopartícula (asumiendo una nanopartícula esférica con un volumen de  $\frac{4}{3} \pi r^3$ ) y la señal electroquímica medida ( $i(\mu\text{A}) = 3.68 \text{ V}(\text{nm}^3) - 36.6$ ,  $R^2 = 0.998$ ,  $\text{RSD} = 9.1 \%$ ,  $n = 6$ ). Una ventaja importante de la metodología propuesta es la versatilidad para determinar tamaños muy diferentes de QDs fuera del rango evaluado en este trabajo. La concentración de la disolución de QDs puede aumentarse si fuera necesario medir tamaños menores con el objetivo de proporcionar suficientes átomos de Cd para ser detectados. Alternativamente, la concentración de QDs podría disminuirse si el tamaño de los QDs fuera mayor con el fin de evitar la saturación de la señal de Cd.

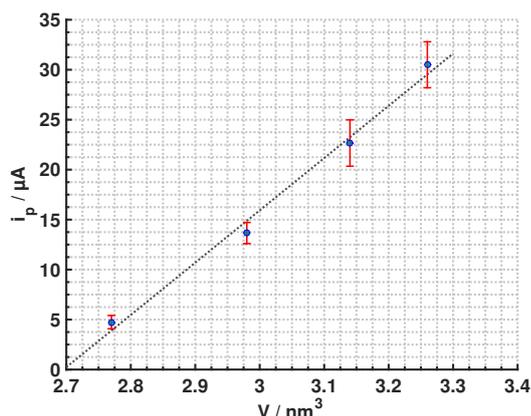


Figura 4.11: Relación entre la señal de Cd(II) frente al volumen de QDs de CdSe de diferentes tamaños (2.77, 2.98, 3.14 y 3.26 nm).

El método desarrollado fue finalmente evaluado para la caracterización de QDs de CdSe sintetizados usando rutas sintéticas alternativas. Para tal propósito, se empleó una disolución comercial de QDs de CdSe diluida a  $6.0 \times 10^{13}$  QDs mL<sup>-1</sup> (100 nM) con CHCl<sub>3</sub>. El espectro de absorbancia para estos QDs comerciales presentó una banda centrada en 560 nm, que pudo ser empleada para la estimación de su tamaño, que siguiendo el método de Peng<sup>242</sup> fue de  $3.30 \pm 0.15$  nm. Un tamaño de  $3.34 \pm 0.07$  nm fue estimado con el método electroquímico propuesto. En vista de los resultados obtenidos por ambos métodos, el método electroquímico es un método adecuado para la determinación del tamaño de estas nanopartículas.

#### COMPARACIÓN CON MÉTODOS ALTERNATIVOS

Otros métodos alternativos empleados para la caracterización de QDs tienen algunas ventajas y desventajas en comparación al método electroquímico desarrollado en este trabajo. Por ejemplo, las ventajas de usar medidas espectrofotométricas y el método de Peng es que es rápido, simple y no requiere tratamiento de muestra. Sin embargo, este método también presenta importantes limitaciones, incluyendo:

- aunque es útil para la caracterización de QDs de CdSe, el método no puede ser aplicado a QDs de otra naturaleza,
- los resultados dependen fuertemente de las interferencias espectroquímicas (cualquier especie concomitante que pueda absorber luz UV en la misma región espectral interferiría en el resultado final).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) proporciona información fidedigna del tamaño de partícula de los QDs. Sin embargo, por su complejidad y coste, este método no es útil para controles rutinarios de muestras que contengan QDs, además, podría sufrir de problemas de agregación durante el tratamiento de muestra. ICP-MS en combinación con TEM o XRD han sido previamente utilizadas para la caracterización de QDs (tamaño y concentración). La técnica es muy sensible para la determinación metálica y altamente robusta sufriendo de pocas interferencias de matriz. Sin embargo, los costes de adquisición y de trabajo de la instrumentación son altos, y requiere de la disolución de QDs para una determinación de la concentración exacta. Otras metodologías proporcionan concentraciones de nanopartículas en términos de masa de sólido por volumen (obtenido tras el secado de una muestra) o en términos de concentración metálica (por ejemplo, mg de Cd por volumen) como con espectroscopia de absorción atómica.

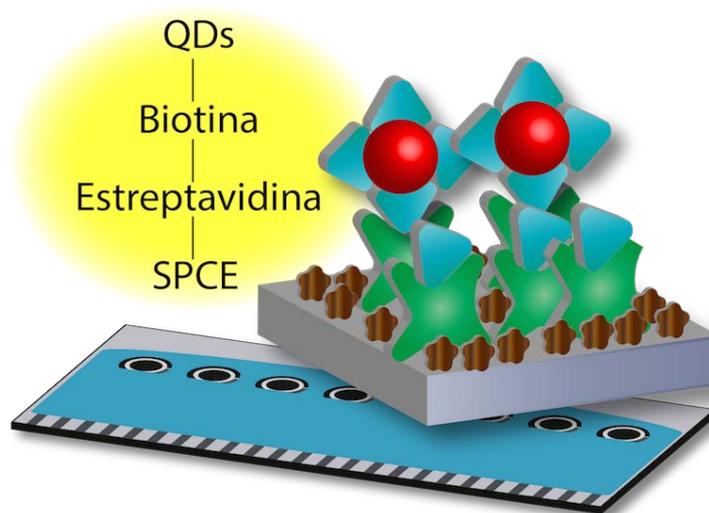
#### 4.7 CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado un método simple, barato y rápido para la determinación de la concentración y la caracterización del tamaño de QDs de Cd. La facilidad de la metodología y el uso de electrodos serigrafiados permiten la caracterización de las nanopartículas por un técnico no especialista. La rápida caracterización electroquímica de QDs en medio orgánico puede ser usada como *screening* en una etapa temprana de la síntesis antes de recubrir el núcleo con la capa externa y las funcionalizaciones posteriores. Por tanto, la información proporcionada por la metodología electroquímica podría complementar otras técnicas más establecidas usadas en análisis rutinarios durante la síntesis de los QDs para el control de calidad de las nanopartículas. La sensibilidad obtenida por la técnica electroquímica (voltamperometría de redisolución anódica) da lugar a la detección de muy bajas concentraciones de QDs y la posibilidad de identificar un amplio rango de tamaños de nanopartícula. Los límites de detección podrían ser mejorados si se incrementa el volumen de muestra o el tiempo de deposición voltamperométrico. Cabe destacar que la metodología desarrollada podría ser aplicada a otros tipos de QDs con un metal electroactivo en el núcleo, extendiendo el uso de este método a un mayor ámbito.



# QUANTUM DOTS COMO MARCA ELECTROQUÍMICA DE BIOSENSORES DESECHABLES

---



## 5.1 INTRODUCCIÓN

La utilización de QDs como marca electroquímica en bioensayos ya fue descrita anteriormente por otros autores utilizando diferentes estrategias de medida. Como se comentó en la introducción, la estrategia más común es la realización de un bioensayo en un pocillo de placas ELISA<sup>249</sup> o con un ensayo magnético externo<sup>250</sup>, y a continuación, una alícuota de la disolución resultante se traslada a la celda electroquímica para realizar la detección. Esta estrategia es bastante compleja, además de que las etapas del bioensayo y la detección no están integradas. Aunque se había descrito también la detección electroquímica directa de los QDs, en este caso, un ensayo magnético externo con el objetivo de

preconcentrar una gran cantidad de reactivos marcados sobre el electrodo, fue la estrategia utilizada para hacer el bioensayo<sup>154</sup>. Por estas razones, el objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de una plataforma integrada utilizando electrodos serigrafiados donde tanto la reacción de afinidad como la detección de QDs se llevara a cabo *in situ* en la misma superficie transductora del biosensor. Esta metodología simplificaría la utilización de QDs en biosensores electroquímicos tanto en el número de etapas de la detección, como reduciendo el volumen de reactivos utilizados ya que la celda electroquímica de un electrodo serigrafiado típico admite como máximo 50  $\mu\text{L}$ . Los electrodos serigrafiados fueron modificados con estreptavidina y se utilizaron QDs funcionalizados con biotina para la optimización de la metodología. Dos tipos de tarjetas serigrafiadas son utilizadas: en primer lugar, electrodos serigrafiados individuales, típicamente utilizados, y en segundo lugar, por su aparición en el mercado durante las fechas en las que el trabajo se llevó a cabo, tarjetas serigrafiadas de 8 canales. A continuación, se realizó un ensayo competitivo de detección de biotina para evaluar la metodología desarrollada. Cabe destacar que en este trabajo se utilizaron QDs comerciales, ya funcionalizados. Según los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se concluye que QDs de mayor tamaño son capaces de generar una señal voltamperométrica mayor ya que poseen un mayor número de átomos metálicos. Por esta razón, se decidió utilizar los QDs comercialmente disponibles (CdSe/ZnS) que emitieran a una mayor longitud de onda (655 nm), propiedad que indica el mayor tamaño de nanopartícula en comparación a QDs que emiten a menor longitud de onda. La detección electroquímica de los metales que componen los QDs se realiza, típicamente, utilizando una película de otro metal que sea capaz de funcionar como preconcentrador según se explicó en el capítulo anterior. Por otro lado, los nanomateriales de carbono pueden proporcionar características mejoradas a los sensores electroquímicos. Por tanto, en primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la superficie sensora para la detección de cadmio, evaluando el efecto de algunos nanomateriales de carbono, y a continuación, se optimizó la película metálica utilizada para la detección. Durante todos los experimentos de la optimización, la superficie del electrodo fue modificada con estreptavidina y BSA con el objetivo de simular las características que tendría el sensor en un bioensayo real.

## 5.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 5.2.1 Metodología del biosensor para la determinación de biotina usando quantum dots como marca

En este apartado se detalla la metodología seguida para llevar a cabo la detección de QDs-BT y de BT, cuya optimización se describe en los próximos apartados.

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE AFINIDAD

Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  (4  $\mu\text{L}$  para las tarjetas multicanal) de una disolución de estreptavidina (en Tris) con una concentración de  $1 \times 10^{-7}$  M fue depositada sobre el electrodo de trabajo para su modificación mediante adsorción física y se almacenó a 4 °C toda la noche. Tras lavar con Tris, se llevó a cabo una etapa de bloqueo colocando 40  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  para las tarjetas multicanal) de una disolución de BSA (2.0 % BSA en Tris) sobre la celda electroquímica durante 30 minutos. Tras otro lavado con Tris, 30  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  para las tarjetas multicanal) de una disolución de QD-BT (para la optimización de la metodología) o una mezcla de biotina y QD-BT (para el ensayo competitivo) fueron colocados en el electrodo durante 30 minutos. A continuación, se llevó a cabo un último paso de lavado con agua ultrapura. En la [Figura 5.1](#) se muestra un esquema del formato del biosensor utilizado en la optimización de la metodología y en la [Figura 5.2](#) se muestra el formato del biosensor para el ensayo competitivo.

#### MEDIDA ELECTROQUÍMICA

Tras la reacción biológica, 1  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M fue añadido sobre el electrodo de trabajo para liberar Cd(II) de los QDs de CdSe/ZnS. A continuación, 40  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  para las tarjetas multicanal) de una disolución reguladora de acetato 0.1 M pH 4.5 con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de Bi(III) fue añadida. Un potencial constante de +1.0 V fue aplicado durante 60 s para activar el electrodo de trabajo. Se llevó a cabo la preconcentración de cadmio en la superficie electródica aplicando un potencial de -1.1 V durante 300 s, y su reoxidación con un barrido de potenciales desde -1.1 V hasta -0.65 V usando voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

## 5.3 OPTIMIZACIÓN DEL TRANSDUCTOR ELECTROQUÍMICO

Para el desarrollo de un biosensor electroquímico es crítico la optimización de la superficie electródica. El comportamiento electroquímico de la señal analítica, la redisolución

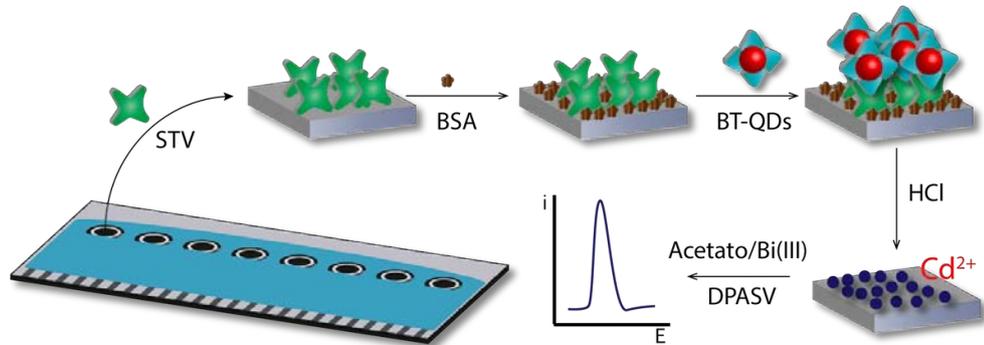


Figura 5.1: Esquema del procedimiento del biosensor para la detección de QDs-BT utilizado para la optimización.

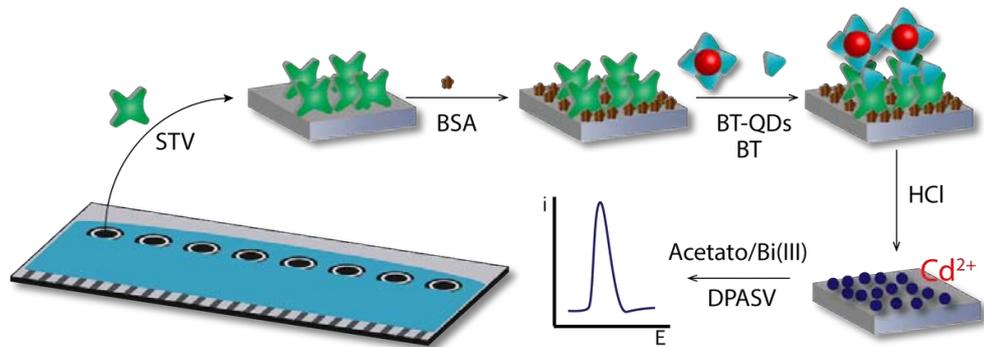


Figura 5.2: Esquema del procedimiento del biosensor competitivo para la detección de biotina usando QDs como marca y su detección *in situ*.

de Cd(II), con diferentes transductores nanoestructurados fue estudiada. Se modificaron SPCEs con nanomateriales como nanofibras de carbono, nanotubos de carbono y óxido de grafeno, y la señal medida fue comparada frente a la obtenida para el electrodo sin modificar. La [Figura 5.3](#) muestra los voltamperogramas de pulso diferencial para los diferentes transductores usando una disolución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II) y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Bi(III). Previamente, la superficie del electrodo fue modificada con estreptavidina ( $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) y BSA (1 %, 30 min) para obtener unas condiciones similares al bioensayo que se realizaría posteriormente, ya que la presencia de proteínas sobre el electrodo podría variar las condiciones en comparación a usar una superficie limpia como fue el caso en el capítulo anterior. Las corrientes de pico obtenidas para los transductores nanoestructurados fueron significativamente más bajas que para los electrodos serigrafiados sin modificar. Este hecho puede explicarse considerando el incremento de la corriente capacitiva, como se observa en las curvas i-E. La modificación de la superficie electródica con nanomateriales causa una mayor adsorción de proteínas en la superficie<sup>79</sup>, incrementando el efecto de la doble capa eléctrica (son especies con una constante dieléctrica mayor y suelen impedir la transferencia electrónica) y disminuyendo la relación señal/ruido. Aunque en la literatura existen muchos ejemplos donde los nanomateriales de carbono mejoran la transferencia electrónica y la sensibilidad de sensores electroquímicos<sup>251</sup>, en este caso, el incremento de la corriente capacitiva juega un papel fundamental en la señal analítica. Además, estos nanomateriales de carbono suelen catalizar la HER, hecho que podría tener también un efecto negativo en la preconcentración metálica, como se describió en el capítulo anterior. Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron con los electrodos sin modificar, y fueron los que se utilizaron en los siguientes experimentos.

A continuación, se optimizó la película metálica para mejorar la preconcentración del cadmio en la superficie electródica. Como se mencionó previamente, esta preconcentración sobre películas de bismuto da lugar a una determinación más sensible que usando una superficie electródica desnuda. Recientemente, se ha descubierto que el Sb puede actuar como un buen metal con propiedades de preconcentración similares al bismuto para metales pesados como Cd y Pb<sup>252</sup>. Se llevó a cabo un estudio de diferentes películas metálicas usando Bi, Sb y una mezcla de Bi/Sb con el objetivo de obtener la mejor superficie para la preconcentración de Cd. Como se describió en el capítulo previo, la deposición *ex situ* fue descartada debido a su baja reproducibilidad y rendimiento, y por tanto, se llevó a cabo la formación *in situ* de la película metálica y el efecto de la concentración metálica fue estudiado. La corriente de pico obtenida usando una disolución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de

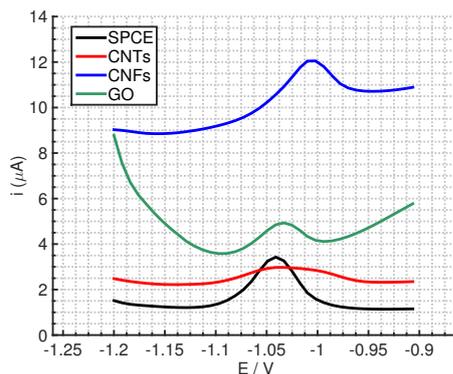


Figura 5.3: Voltamperogramas de pulso diferencial para  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$  en una disolución reguladora de acetato ( $0.1 \text{ M}$  y  $\text{pH } 4.5$ ) usando electrodos modificados con diferentes nanomateriales: (negro) electrodos sin modificar, (rojo) nanotubos de carbono, (verde) óxido de grafeno, y (azul) nanofibras de carbono.

$\text{Cd(II)}$  fue comparada para diferentes concentraciones de  $\text{Bi(III)}$ ,  $\text{Sb(III)}$  y una mezcla de  $\text{Bi(III)/Sb(III)}$ . Para las disoluciones con presencia de  $\text{Sb}$  se utilizó una disolución de  $\text{HCl}$   $0.01 \text{ M}$ , ya que es un medio perfectamente válido para películas de este metal. Para el caso del  $\text{Bi}$ , se utilizó una disolución reguladora de acetato ( $0.1 \text{ M}$  y  $\text{pH } 4.5$ ). Los mejores resultados se encontraron para las siguientes condiciones:  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Sb(III)}$  y para la mezcla  $\text{Bi/Sb}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$  y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Sb(III)}$ . La [Figura 5.4](#) muestra que la película más óptima para la preconcentración de cadmio fue obtenida con una disolución de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$ . A pesar de eso, el uso de  $\text{Sb}$  o la mezcla  $\text{Bi/Sb}$  podría ser interesante cuando un medio más ácido fuera necesario ya que la mayor ventaja de utilizar las películas de  $\text{Sb}$  o de  $\text{Bi/Sb}$  para la determinación de metales pesados es la posibilidad de utilizar un medio ácido ( $\text{pH } 2$ ), ya que la reacción de evolución del hidrógeno ( $\text{HER}$ ) está más impedida con estas películas (aparece a un potencial más negativo) y por tanto, presenta una menor interferencia con la reducción de  $\text{Cd}^{253}$ . Por tanto, este tipo de películas podrían ser útiles para ciertas aplicaciones donde un medio más ácido fuera necesario y que no puede ser utilizado con una película totalmente de bismuto (aplicando potenciales tan negativos como los que se utilizan aquí).

#### 5.4 EFECTO DEL POTENCIAL DE ACTIVACIÓN Y DE LA DIGESTIÓN ÁCIDA

Para algunos procesos electroquímicos donde la superficie electródica tiene un especial efecto es necesario utilizar una superficie reproducible y con las mejores condiciones, al-

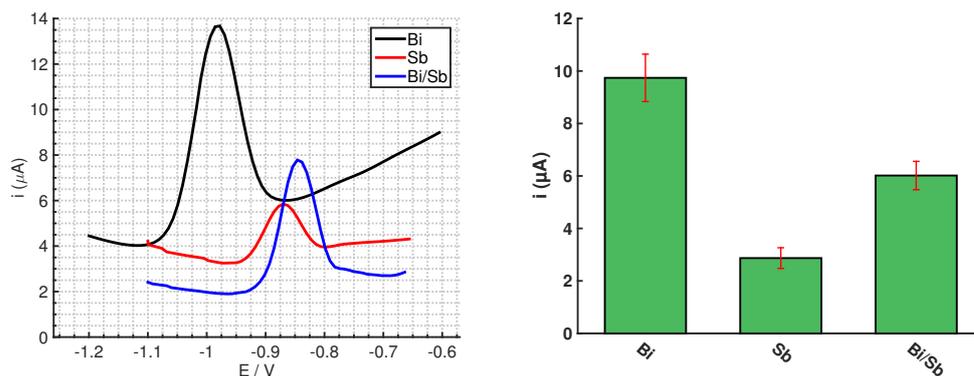


Figura 5.4: Voltamperogramas de pulso diferencial para  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{2+}$  en disolución regulador de acetato ( $0.1 \text{ M}$  y  $\text{pH } 4.5$ ) usando diferentes películas metálicas: (negro)  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$ , (rojo)  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Sb(III)}$ , y (azul)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Bi(III)}$  y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Sb(III)}$ . *Inset*: corrientes de pico medias ( $n=3$ ) para cada película metálica utilizada.

go que se podría conseguir con un pretratamiento previo. En electrodos convencionales es usual el pulido para la regeneración de la superficie o la aplicación de tratamientos (electro)químicos hasta obtener una respuesta reproducible. En el caso de los electrodos serigrafados de carbono, se ha visto como un tratamiento químico<sup>11</sup> o electroquímico<sup>10</sup> previo a la medida podría producir una mejora significativa en la respuesta analítica. Aunque para muchos procesos no es necesario este pretratamiento, en el capítulo anterior se observa como la detección de  $\text{Cd}$  proveniente de QDs puede ser mejorada con la aplicación de un potencial positivo justo antes de realizar la preconcentración metálica.

Por tanto, se comprobó el efecto de la activación electródica de los electrodos serigrafados de carbono para la medida electroquímica de QDs tras un ataque ácido. El objetivo principal era conseguir una mejora significativa sin añadir más etapas que complicaran el proceso de medida, por lo que se estudió el efecto de la aplicación de un potencial positivo justo antes de la electrodeposición de cadmio utilizando la misma disolución de medida. Para ello, una gota de  $10 \mu\text{L}$  de QDs ( $10 \text{ nM}$ ) fue depositada sobre la superficie del electrodo de trabajo hasta su secado completo. A continuación, se llevó a cabo la medida de una disolución del  $\text{Cd}$  de los QDs en diferentes condiciones:

- sin realizar un ataque ácido y sin la aplicación de un potencial de activación (detección directa de QDs),
- sin realizar el ataque ácido pero aplicando un potencial previo de  $+1.0 \text{ V}$  durante  $60 \text{ s}$ ,
- con un ataque ácido añadiendo  $1 \mu\text{L}$  de  $\text{HCl } 1\text{M}$  sin aplicar el potencial de activación,

- con el ataque ácido añadiendo 1  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M y aplicando un potencial previo de +1.0 V durante 60 s.

La Figura [Figura 5.5](#) muestra las DPV obtenidas para cada uno de los cuatro casos antes descritos. El ataque ácido es crucial para liberar una importante cantidad de átomos de Cd(II) a la disolución y obtener una medida más sensible de los QDs. Aunque se pueden detectar los QDs directamente sin llevar a cabo la digestión ácida, es probable que el Cd medido provenga solamente de defectos superficiales de las nanopartículas, por lo que la mayor parte del metal no estará disponible para la detección, como ocurre con la digestión ácida. Además, existe un efecto positivo del potencial de activación en la señal analítica ya que una intensidad de pico mayor es obtenida tras la aplicación de este potencial. Por tanto, incluso sin material proteico adsorbido en la superficie electródica, el potencial de activación mejora la señal analítica. Este hecho podría ser debido a una (o ambas) de estas razones: por la activación de la superficie electródica incrementando el área superficial<sup>12</sup> o por una mayor degradación de los QDs con la consecuente liberación de más átomos de Cd(II) a la disolución. La oxidación de QDs con la aplicación de un potencial positivo puede conducir a una degradación de estas nanopartículas, liberando más cantidad de metales a la disolución. Por otro lado, en una superficie con material proteico, la aplicación de este potencial también podría ayudar a desorber las proteínas de la superficie (incluso a su desnaturalización), dejando un mayor área disponible para la preconcentración metálica algo que mejoraría la señal analítica (ya que la corriente de pico es proporcional al área electródica disponible para la ET). En este caso, se obtiene una señal significativamente mayor para la detección de Cd(II) de los QDs, probablemente por dos razones: estos QDs comerciales emiten a 655 nm, indicando un mayor tamaño de partícula que los QDs sintetizados, y por tanto, mayor cantidad de átomos metálicos, y por otro lado, el secado completo de la disolución sobre la superficie del electrodo de trabajo es capaz de preconcentrar en mayor medida las especies detectadas.

El efecto de la aplicación de diferentes potenciales positivos (+0.6, +1.0, +1.2 V) durante diferentes tiempos (60, 120 s) fue estudiado y se observó como la señal analítica más alta se obtuvo con la aplicación de +1.00 V durante 60 s ([Figura 5.6](#)).

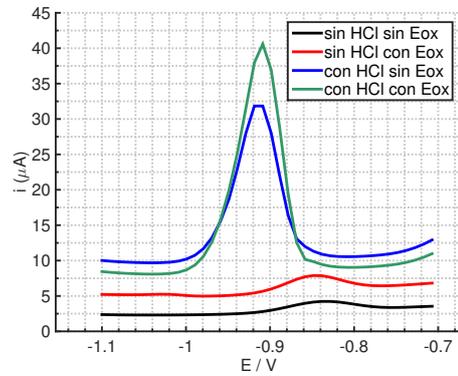


Figura 5.5: Voltamperogramas de pulso diferencial para una disolución de 1 nM QDs en reguladora de acetato (0.1 M y pH 4.5): (verde) tras la adición de HCl 1 M y aplicar un potencial de activación de +1.00 V durante 60 s, (azul) tras la adición de HCl 1 M pero sin aplicar el potencial de activación, (negro) sin añadir HCl y sin aplicar el potencial de activación, y (rojo) sin añadir HCl pero aplicando un potencial de activación de +1.00 V durante 60 s.

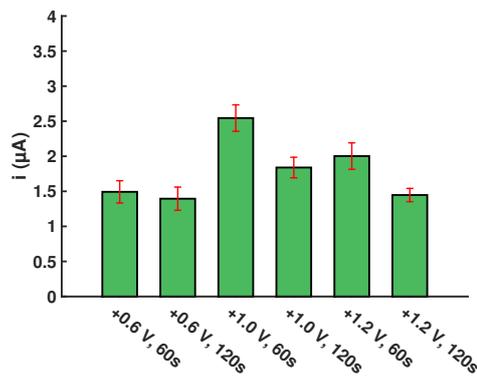


Figura 5.6: Efecto del potencial de activación en la corriente de pico voltamperométrica.

### 5.5 OPTIMIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN ÁCIDA DE QUANTUM DOTS

Como se ha visto, la disolución de los QDs mediante un ataque ácido es crítico para la liberación de un amplio número de átomos de Cd(II) a la disolución y tenerlos disponibles para la medida electroquímica. Esto es especialmente importante cuando las proteínas usadas en el biosensor recubren la superficie electródica disminuyendo el área electroactiva<sup>254</sup>. Por tanto, una etapa crítica es el ataque ácido de los QDs, para la cual se optimizaron los diferentes parámetros que pueden tener una influencia en la señal analítica. El efecto de diferentes ácidos como HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HClO<sub>4</sub> fue estudiado usando diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1 y 2 M) y diferentes volúmenes (1, 2, 5 y 10  $\mu$ L). Además, el efecto del pH y concentración de la disolución reguladora (acetato) fue, también, evaluado para verificar si un mayor efecto regulador fuera necesario para evitar una disminución del pH. Las mayores corrientes de pico fueron obtenidas usando 1  $\mu$ L de HCl 1 M y 40  $\mu$ L de reguladora de acetato 0.1 M pH 4.5. En el caso de utilizar un volumen o concentración de ácido mayor (excepto para 2  $\mu$ L, cuyos resultados fueron similares), la mayor producción de la HER dificultó la preconcentración metálica, obteniendo menores señales analíticas.

Por otro lado, el efecto del tiempo del ataque ácido de los QDs fue estudiado. Tras la adición de 1  $\mu$ L de HCl 1 M en el electrodo de trabajo, se esperó un pequeño tiempo (0, 30, 60 y 120 s) para que se produjera el ataque ácido a las nanopartículas antes de añadir la disolución reguladora y llevar a cabo la medida electroquímica. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos estudiados. Este hecho sugiere que la digestión de las nanopartículas ocurre prácticamente de manera instantánea en este medio ácido (HCl 1 M), y el tiempo del ataque ácido no afecta a la liberación del Cd(II) a la disolución. Probablemente, el confinamiento en la superficie electródica de los QDs permite un contacto íntimo con el ácido añadido, y 1  $\mu$ L es suficiente para conseguir la digestión total. 1  $\mu$ L de una disolución de HCl 1 M contiene 1  $\mu$ mol de H<sup>+</sup>, por lo que está en una concentración muy en exceso en comparación a la cantidad de QDs con la que se trabaja del orden de cientos fmoles de QD (y considerando que los QDs pueden tener alrededor de centenares de átomos metálicos<sup>220</sup>).

### 5.6 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOSENSOR

Las diferentes condiciones experimentales que afectan a la estrategia del biosensor fueron optimizadas. Como se ha descrito previamente, se desarrolló un biosensor para biotina

funcionalizada con quantum dots usando estreptavidina como elemento de reconocimiento. Un esquema de esta estrategia se puede ver en la [Figura 5.1](#). Por tanto, los parámetros del biosensor que afectan a la señal analítica en este caso fueron: la concentración de estreptavidina utilizada para la modificación del electrodo y el tiempo de la reacción de afinidad entre la biotina y la estreptavidina. Para prevenir la adsorción no específica, antes de llevar a cabo la reacción de afinidad, se realizó una etapa de bloqueo utilizando BSA como agente bloqueante, y la concentración de BSA y el tiempo de bloqueo fueron, también, optimizados. Una concentración de BSA del 2 % y un tiempo de bloqueo de 30 min fueron los más adecuados. Por otro lado, las condiciones más adecuadas para la voltamperometría de redisolución como el potencial y tiempo de deposición, la amplitud, escalón de potencial y tiempo de pulso fueron optimizadas. Como se comentó anteriormente, la técnica electroquímica utilizada fue voltamperometría de pulso diferencial ya que resultó ser más reproducible en comparación a voltamperometría de onda cuadrada (técnica que también fue evaluada). La señal analítica medida para diferentes concentraciones de estreptavidina (usando un volumen constante de 10  $\mu\text{L}$  para la inmovilización en el electrodo) y diferentes tiempos de la reacción de afinidad alcanzó el máximo valor para una concentración de estreptavidina de  $1 \times 10^{-7}$  M ([Figura 5.7](#)) y a partir de 30 minutos de reacción. Los parámetros de la voltamperometría de redisolución anódica con pulso diferencial que tuvieron un mayor efecto en la señal analítica fueron el tiempo de deposición, y la amplitud y tiempo del pulso. Incluso un pequeño cambio en estos parámetros producían un cambio significativo en la señal analítica, y por tanto, en la sensibilidad del método. Los valores optimizados fueron: -1.1 V para el potencial de deposición, 300 s para el tiempo de deposición, 50 mV para la amplitud del pulso, 10 mV para el escalón de potencial, 10 ms para el tiempo de pulso y 100 ms para el tiempo de intervalo. Estos valores fueron también empleados en el trabajo descrito en el próximo capítulo, donde también se utilizan quantum dots como marca electroquímica de biosensores.

## 5.7 COMPORTAMIENTO ANALÍTICO DE ELECTRODOS SERIGRAFIADOS INDIVIDUALES

Tras la optimización de la metodología experimental, el biosensor diseñado fue utilizado para llevar a cabo una calibración con diferentes concentraciones de BT-QDs, siguiendo la estrategia descrita en la [Figura 5.1](#). La señal analítica aumentó de forma lineal con concentraciones crecientes de BT-QDs. Se obtuvo un rango lineal entre  $5 \times 10^{-10}$  -  $5 \times 10^{-9}$

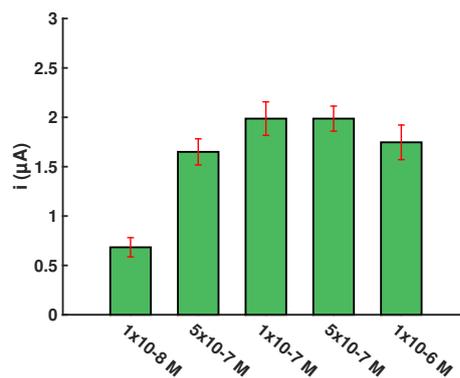


Figura 5.7: Efecto de la concentración de estreptavidina en la respuesta analítica del biosensor.

M (en términos de QDs) con una correlación ( $R^2$ ) de 0.998 siguiendo la ecuación:  $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $0.14 + 1.22 [\text{BT-QDs}] (10^{-9} \text{ M})$ . El límite de detección calculado fue de  $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ , y la reproducibilidad de la señal analítica obtenida fue del 5.0% ( $n = 3$ ) en términos de RSD usando diferentes dispositivos.

#### 5.8 COMPORTAMIENTO ANALÍTICO DE TARJETAS SERIGRAFIADAS MULTICANAL

El método desarrollado para electrodos serigrafiados individuales fue aplicado a las tarjetas serigrafiadas de 8 canales (Figura 2.1). Estas tarjetas multicanal fueron descritas en profundidad en la sección Experimental de la Tesis Doctoral. Los desarrollos recientes en la tecnología de los potenciostatos están facilitando la medida electroquímica de varios electrodos simultáneamente. Por ejemplo, el potenciostato multicanal  $\mu\text{Stat}8000$ , comercializado por DropSens y utilizado en este trabajo, permite la utilización de este tipo de tarjetas o placas serigrafiadas de 96 canales<sup>9</sup>. Con esta plataforma, es posible llevar a cabo 8 medidas simultáneas usando las mismas o diferentes condiciones experimentales y técnicas electroquímicas. Cabe destacar que esta tecnología ha permitido un ahorro de tiempo considerable en los trabajos desarrollados durante esta Tesis Doctoral.

Para llevar a cabo la metodología desarrollada en SPCEs individuales a los SPCEs multicanal fue necesario, en primer lugar, el cambio del volumen empleado de las disoluciones debido a la mayor miniaturización de estas tarjetas ya que cada celda electroquímica puede contener como mucho  $30 \mu\text{L}$  de muestra, y el área geométrica del electrodo es menor ( $5.15$  vs.  $12.56 \text{ mm}^2$ ). Por tanto, un volumen de  $25 \mu\text{L}$  fue empleado para las diferentes etapas del biosensor, excepto para la modificación inicial con estreptavidina, para la cual

solamente 4  $\mu\text{L}$  fue empleada. La relación de volúmenes en esta etapa fue de 2.5 (10  $\mu\text{L}$  vs 4  $\mu\text{L}$ ) que atiende aproximadamente a la relación de áreas geométricas ( $12.56/5.15 = 2.4$ ). Por otro lado, se llevó a cabo la optimización de las condiciones experimentales de nuevo en estos dispositivos con el objetivo de evaluar si la disminución del área electródica podía tener un efecto en las condiciones más óptimas. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos, y las mismas condiciones que para SPCEs individuales fueron utilizadas.

A continuación, se llevó a cabo una recta de calibrado con concentraciones crecientes de BT-QDs usando las tarjetas multicanal ([Figura 5.8](#)). Un rango lineal de  $1 \times 10^{-9}$  -  $1.2 \times 10^{-8}$  M (en términos de QDs) con una correlación ( $R^2$ ) de 0.990 fue obtenido siguiendo la ecuación:  $i_p (\mu\text{A}) = 0.54 [\text{BT-QDs}] (\times 10^{-9} \text{ M}) + 0.02$ . El límite de detección calculado fue de  $4 \times 10^{-10}$  M y la reproducibilidad entre tarjetas multicanal fue de 8.5% ( $n = 3$ ). La sensibilidad (pendiente de la recta de calibrado) obtenida es más baja que utilizando electrodos individuales y la relación entre ambas pendientes concuerda con la relación entre las diferentes áreas electródicas (por lo que normalizando la respuesta con el área, los resultados son coincidentes). Aunque el límite de detección es ligeramente menor utilizando electrodos individuales, los beneficios de usar las tarjetas de 8 canales son evidentes. La facilidad de la metodología es clara ya que cada etapa se lleva a cabo utilizando micropipetas de 8 canales y las etapas de lavado se realizan simultáneamente. Además, cabe destacar las ventajas de estas tarjetas cuando el procedimiento depende del tiempo, como en la mayoría de los biosensores electroquímicos. Usando las tarjetas multicanal es posible realizar un gran cantidad de análisis en muy poco tiempo, y por tanto, en situaciones donde se requiere llevar a cabo la detección de gran cantidad de muestras, estos dispositivos son una excelente opción para ahorrar costes.

## 5.9 ENSAYO COMPETITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOTINA

El funcionamiento del biosensor electroquímico multicanal fue evaluado para la determinación de biotina. Un ensayo competitivo de un paso se llevó a cabo entre biotina libre y biotina marcada con QDs frente a los sitios de enlace de la superficie electródica modificada con estreptavidina. Un esquema de este ensayo se representa en la [Figura 5.2](#), y la metodología está descrita en la [Sección 5.2.1](#). La señal voltamperométrica decreció con concentraciones crecientes de biotina en la disolución ya que una cantidad mayor de biotina puede enlazarse a la estreptavidina de la superficie sensora y menos sitios quedarían disponibles para la BT-QDs, que es la especie responsable de producir la señal electroquí-

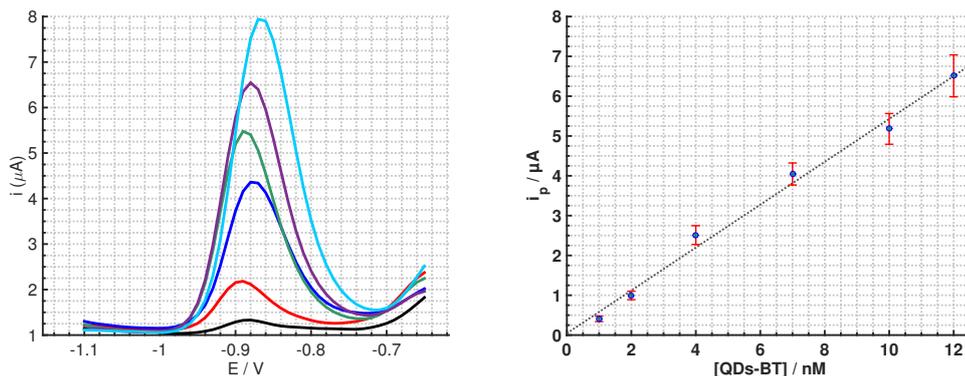


Figura 5.8: Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el biosensor multicanal en presencia de diferentes concentraciones de BT-QDs (a)-(f):  $1, 2, 4, 7, 10$  y  $12 \times 10^{-9}$  M. *Inset*: recta de calibrado para el biosensor en función de la concentración de BT-QDs. Las condiciones experimentales fueron las optimizadas en el trabajo.

mica. Una concentración constante de  $1.2 \times 10^{-8}$  M de BT-QDs (en términos de QDs) fue elegida para hacer el ensayo. Una dependencia lineal entre  $i/i_0$  (%) y el logaritmo de la concentración de biotina fue encontrada desde  $1 \times 10^{-9}$  M hasta  $1 \times 10^{-7}$  M (Figura 5.9), donde  $i_0$  es la corriente obtenida en ausencia de biotina e  $i$  es la corriente cuando biotina libre se encuentra presente en la disolución. Según el método que se indica en la introducción para este tipo de curvas (rango dinámico para la respuesta entre un 20 y 80 % del máximo), se define que el rango dinámico es entre  $2 \times 10^{-9}$  M y  $7 \times 10^{-8}$  M, con un límite de detección de  $0.9 \times 10^{-9}$  M de biotina fue estimado (señal para una disminución del 10 % de la máxima respuesta) y se calculó una RSD de 5.9 % ( $n = 3$ ) para la pendiente de diferentes rectas de calibrado, indicando una buena reproducibilidad en la metodología. La utilización de QDs como marca electroquímica de biosensores con detección *in situ* sobre electrodos serigrafados ofrece buenos resultados, obteniendo una detección aceptable de biotina en un rango de concentraciones del orden de nM. La adsorción física del elemento de reconocimiento es una metodología sencilla, y muy adecuada para este tipo de biosensores con QDs. Por otro lado, una comparación con algunos de los métodos electroquímicos propuestos en la literatura para la determinación de biotina (Tabla 5.1), muestran que este sensor es bastante competitivo en términos de límites de detección y rango lineal con otros biosensores (o bioensayos) donde se utilizan marcas de detección enzimáticas o marcas altamente amplificadas como los liposomas. Solamente un caso, en el que la detección se lleva a cabo en un sistema de análisis por inyección de flujo con preconcentración magnética (FIA), presenta características analíticas muy superiores al sensor desarrollado en esta Tesis Doctoral. Esto pone de manifiesto el buen comportamiento de los QDs como marca

| Referencia  | LOD (nM) | Rango (nM) |
|---|----------|------------|
| Avidina-HRP <sup>255</sup>  | -        | 285 - 8000 |
| Anticuerpo anti-BT y BT-liposoma [(Fe(CN <sub>6</sub> )] <sup>4-</sup> ) <sup>256</sup> | 14       | 1 - 1000   |
| MB-STV + HRP-BT <sup>65</sup>   | 84       | 94 - 240   |
| MB-STV + HRP-BT (FIA) <sup>257</sup>  | 0.008    | 0.01 - 1   |
| MB-STV + HRP-BT (8xSPCEs) <sup>64</sup>   | 0.2      | 0.2 - 250  |

Tabla 5.1: Características analíticas de otros ensayos electroquímicos competitivos para la detección de biotina.

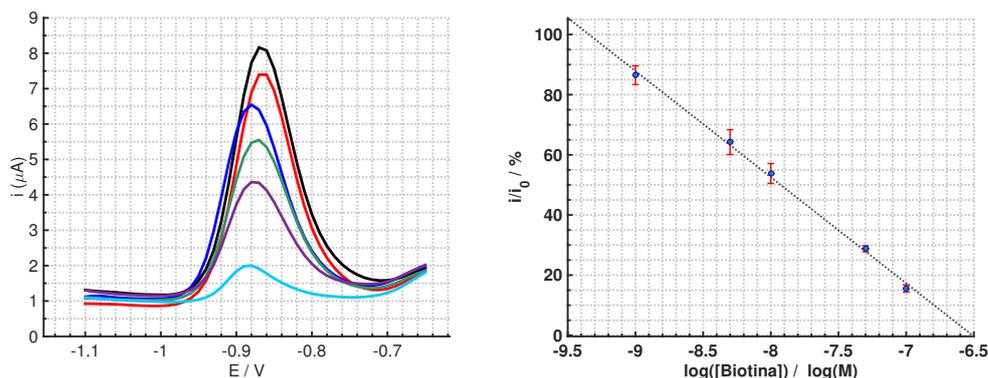


Figura 5.9: Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el biosensor multicanal registrados para el ensayo competitivo en presencia de concentraciones crecientes de biotina: 0, 1, 5, 10, 50 y  $100 \times 10^{-9}$  M. *Inset*: recta semilogarítmica de la correspondiente curva de calibrado.

de detección, incluso de una manera integrada y su detección *in situ* en la superficie del transductor.

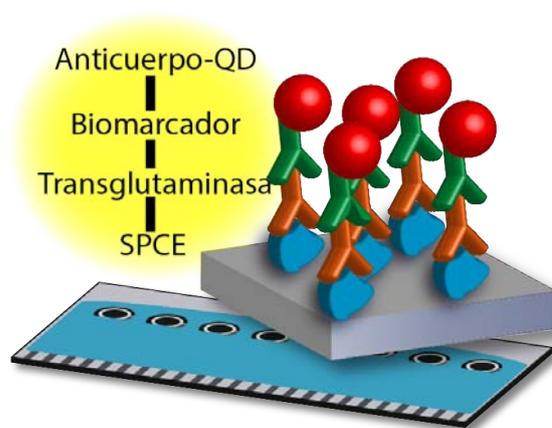
## 5.10 CONCLUSIONES

Existe un reciente interés en el desarrollo de dispositivos miniaturizados para resolver problemas analíticos clínicos y medioambientales. Dentro de las herramientas y marcas de detección desarrolladas, los electrodos serigrafiados con la detección *in situ* de quantum dots proporcionan una plataforma excelente para el desarrollo de biosensores electroquímicos desechables. La estrategia presentada en este trabajo tiene claras ventajas: un procedimiento simple y rápido usando una tarjeta serigrafiada que permite la realización de ocho análisis simultáneos, obteniendo una gran cantidad de datos en un corto período de tiempo. Además, la detección electroquímica *in situ* de QDs en la misma plataforma donde se realiza la reacción de afinidad, es una clara ventaja a la mayoría de procedi-

mientos más complejos publicados hasta ahora para la detección electroquímica de QDs. Este sistema puede ser aplicado a diferentes biomarcadores clínicos, como se describe en el próximo capítulo, y abriendo la posibilidad a utilizar diferentes quantum dots para la detección multianalito en biosensores desechables.

# BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE LA ENFERMEDAD CELÍACA USANDO QUANTUM DOTS COMO MARCA

---



## 6.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de este capítulo fue el desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la determinación de biomarcadores de la enfermedad celíaca usando la detección *in situ* de quantum dots en electrodos serigrafiados siguiendo la metodología desarrollada para el sistema biotina-estreptavidina en el capítulo anterior. De este modo, se pudo evaluar el funcionamiento de esta metodología en un problema clínico real con muestras más complejas. Dos de los biomarcadores más importantes de la enfermedad celíaca fueron utilizados: anticuerpos anti-transglutaminasa de tipo IgG e IgA, cuya importancia ya se ha reseñado en la introducción de la Tesis Doctoral.

En primer lugar, se desarrolló un biosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa (IgG anti-tTG). Para la fabricación de este biosensor, se utilizaron tarjetas serigrafiadas de 8 canales como transductores y se modificaron con transglutaminasa tisular (tTG) por adsorción física en la superficie electródica. A continuación, una reacción inmunológica tipo sandwich se llevó a cabo en varias etapas: reacción con suero humano que contiene el analito de interés (IgG anti-tTG), seguido de la inmunoreacción con anticuerpos anti-IgG humana marcados con QDs de CdSe/ZnS (comerciales) y de la detección electroquímica de Cd proveniente de los QDs. Todos los pasos fueron realizados usando las tarjetas serigrafiadas como soporte sólido y la detección de Cd(II) se llevó a cabo *in situ* tras el ataque ácido de los QDs por medio de voltamperometría de redisolución anódica. Se optimizaron las condiciones experimentales de la metodología y se evaluaron sus características analíticas, precisión y estabilidad del biosensor usando controles séricos de diferentes concentraciones de IgG anti-tTG.

Tras evaluar el correcto funcionamiento con este sistema inmunológico, se intentaron nuevas estrategias para mejorar el biosensor como la eliminación de etapas con el objetivo de reducir el tiempo de análisis y su complejidad, para acercarse a un sistema POC ideal. En la literatura existen muchos ejemplos de biosensores electroquímicos con procedimientos complejos, donde varias reacciones biológicas y etapas de lavado son necesarias<sup>258,259</sup>. Estos procedimientos se alejan de los conceptos ideales de un dispositivo POC. Además, la mayoría de los bioensayos, y especialmente inmunoensayos, requieren de una etapa de bloqueo de la superficie electródica para minimizar la adsorción no específica de proteínas interferentes que se encuentran en los reactivos o la muestra, y que pueden dar lugar a una señal de fondo alta que disminuye la relación señal/ruido y, por tanto, la sensibilidad. Esta etapa de bloqueo se lleva a cabo, usualmente, con proteínas inertes como albúmina de suero bovino (BSA) o caseína, que incrementa la complejidad del procedimiento y el tiempo y coste de análisis. Sin embargo, esta etapa de bloqueo es, normalmente, asumida por los investigadores en este campo y existen pocos trabajos en los que se intenta eliminar, y en algunos casos por estrategias de lavado ciertamente complejas<sup>260</sup>. Por otro lado, la modificación de los electrodos serigrafiados con el elemento de reconocimiento se lleva a cabo, típicamente, modificando solamente el electrodo de trabajo<sup>49,261</sup>. Sin embargo, el carácter hidrofóbico del electrodo inicial dificulta un recubrimiento completo de la superficie por el elemento de reconocimiento presente en disolución acuosa. Además, si sólo se modifica el electrodo de trabajo, el resto de la celda electroquímica sigue estando disponible para adsorciones inespecíficas. Esta compleja metodología con varias reaccio-

nes (incluyendo bloqueo de la adsorción no específica) y etapas de lavado es uno de los principales problemas para la introducción de nuevos inmunosensores electroquímicos en aplicaciones comerciales. Por tanto, se espera que el desarrollo de estrategias más simples y rápidas tengan una importancia determinante en el futuro de estos dispositivos. En este capítulo, se ha desarrollado una metodología para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG eliminando la típica etapa de bloqueo y llevando a cabo la detección *in situ* de QDs como marca electroquímica. Tras eliminar la etapa de bloqueo, se evaluó tanto un bioensayo de varias etapas con etapas de lavado intermedias, como un bioensayo de una sola etapa, en el cual todos los reactivos biológicos reaccionan simultáneamente. Esta metodología es mucho más simple y consume un menor tiempo que otros biosensores publicados para la determinación de biomarcadores de la enfermedad celíaca.

## 6.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 6.2.1 Metodología del biosensor para la determinación de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa usando quantum dots como marca

#### PROCEDIMIENTO DEL INMUNOENSAYO

Una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de una disolución de tTG con una concentración de 0.1  $\text{mg mL}^{-1}$  fue depositada en la superficie de cada electrodo de trabajo y se almacenó a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante la noche. Tras el lavado con Tris, se llevó a cabo una etapa de bloqueo con 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de caseína (20  $\text{mg mL}^{-1}$  de caseína en Tris) durante 45 minutos. La detección de anticuerpos IgG anti-tTG se realizó incubando el inmunosensor con controles de suero humano (diluidos 1:2 en Tris) durante 60 minutos seguidos de un nuevo paso de lavado con Tris. Finalmente, 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de anti-H-IgG-QD (concentración de QDs de 10 nM) con 1  $\text{mg mL}^{-1}$  de BSA fue depositado sobre los electrodos durante 60 minutos. Un último paso de lavado con agua ultrapura se llevó a cabo. Entonces, el electrodo se conectó al potencióstato para el análisis electroquímico. En la [Figura 6.1](#) se muestra un diagrama del inmunoensayo usando esta metodología.

#### MEDIDA ELECTROQUÍMICA

La etapa de medida se llevó a cabo siguiendo la metodología explicada en la [Sección 5.2.1](#).

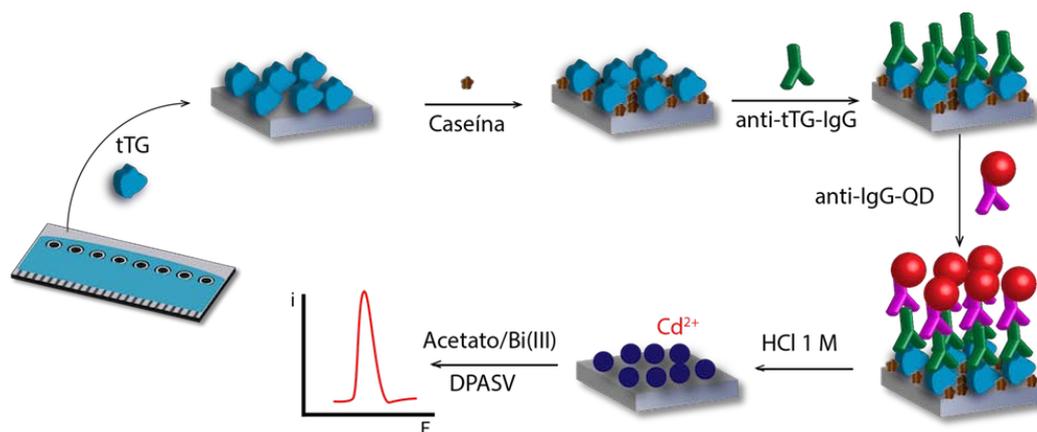


Figura 6.1: Esquema del procedimiento del biosensor para la detección de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa.

### 6.2.2 Metodologías del biosensor para la determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa usando quantum dots como marca

#### INMOVILIZACIÓN DEL ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO

Los SPCEs de 8 canales fueron lavados con reguladora Tris y se dejaron secar para generar una superficie hidrofílica. Después, una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de una disolución de tTG (en Tris) con una concentración de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  fue añadida poniendo especial énfasis en recubrir completamente la superficie de toda la celda electroquímica de cada electrodo (incluyendo los electrodos de referencia y auxiliar). Se almacenó durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  hasta secarse completamente. Con este procedimiento se fabrican los inmunosensores.

#### METODOLOGÍA MULTI-ETAPA

En primer lugar, el inmunosensor preparado fue lavado con Tris. La detección de anticuerpos IgA anti-tTG se llevó a cabo tras incubar el inmunosensor con 25  $\mu\text{L}$  de una disolución sérica (1:2 en Tris) durante 60 minutos y una etapa de lavado con Tris. 25  $\mu\text{L}$  de  $7.5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de una disolución de anti-H-IgA-BT (con  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA) fue añadida al sensor durante 60 minutos seguido de otra etapa de lavado con Tris. Finalmente, 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de QD-STV (10 nM en términos de QDs) fueron añadidos y se dejaron incubar durante 30 minutos. Un paso final de lavado con agua ultrapura se llevó a cabo antes de la medida. En ese momento, la tarjeta serigrafiada se conectó al potencióstato para el análisis electroquímico. En la [Figura 6.2](#) se muestra un diagrama esquemático del inmunoensayo usando esta metodología.

#### METODOLOGÍA DE UNA ETAPA

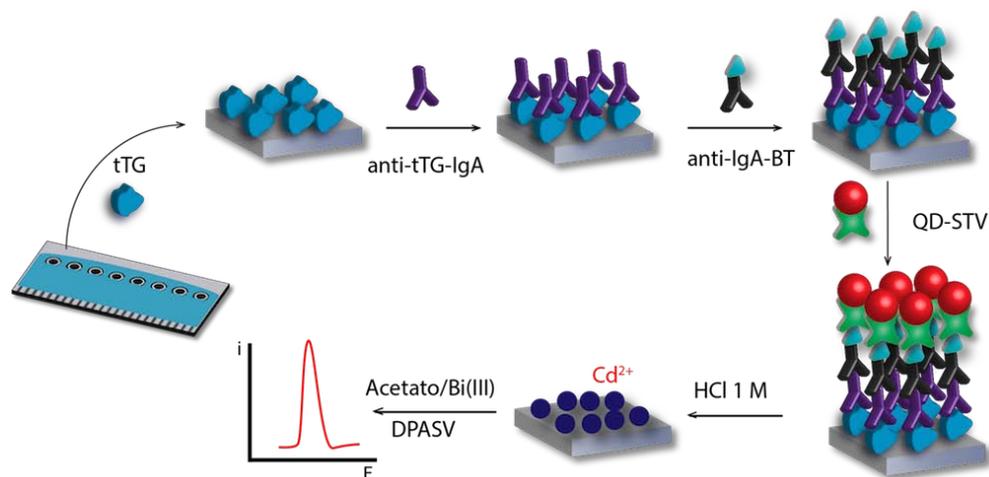


Figura 6.2: Esquema del inmutensur electrolímico para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG con el bioensayo de varias etapas.

El inmutensur preparado se lavó con Tris. La detección de anticuerpos IgA anti-tTG se llevó a cabo incubando el inmutensur durante 80 minutos con 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de un calibrador sérico (10  $\mu\text{L}$ ) de concentración conocida, anti-H-IgA-BT (1  $\mu\text{L}$ , 190  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en Tris), QD-STV (1  $\mu\text{L}$ , 250 nM en Tris) y reguladora Tris (13  $\mu\text{L}$ ). Un paso final de lavado con agua ultrapura fue llevado a cabo. Entonces, la tarjeta serigrafiada fue conectada al potencióstato para el análisis electrolímico. En la [Figura 6.3](#) se muestra un diagrama esquemático del inmutensur usando esta metodología.

#### MEDIDA ELECTROLÍMICA

La etapa de medida sigue el procedimiento previamente descrito. Para la metodología de una etapa, se utilizó un tiempo de deposición de 400 s en lugar de 300 s como fue el caso para la metodología multi-etapa.

### 6.3 OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DEL BIOSENSOR PARA ANTICUERPOS IGG ANTI-TRANSGLUTAMINASA

#### 6.3.1 Estudio de la biofuncionalidad del sensor y la adsorción no específica

Las condiciones de trabajo iniciales para la evaluación de la biofuncionalidad del transductor modificado con tTG fueron: 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$  de tTG, 12 nM de anti-H-IgG-QD, 20  $\text{mg mL}^{-1}$  de BSA como reactivo de bloqueo, 30 min como tiempo de bloqueo y 60 min para las inmunorreacciones. La señal analítica obtenida por el biosensor con las condiciones de

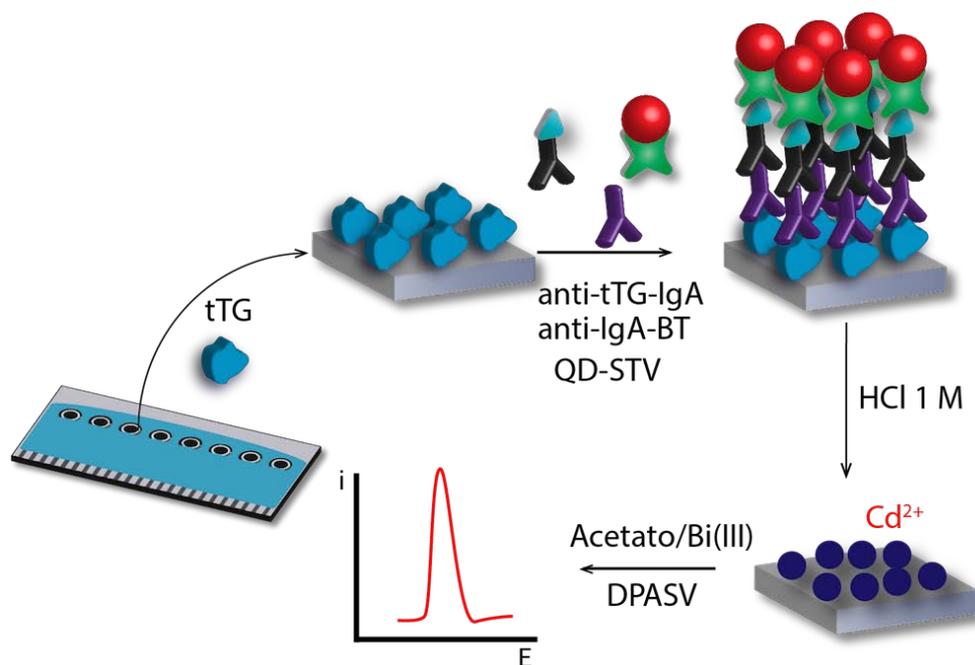


Figura 6.3: Esquema del inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG con el bioensayo de una sola etapa.

trabajo iniciales fue evaluada usando controles de suero positivos y negativos provenientes de un kit ELISA comercial para la detección de IgG anti-tTG. Los resultados obtenidos (Figura 6.4A) muestran cómo el biosensor presentó un comportamiento adecuado ya que la corriente de pico para el control positivo fue significativamente mayor que para el control negativo. La elevada señal obtenida para el control negativo parece ser debido al efecto de adsorciones inespecíficas. Tanto las muestras reales como estos controles de suero contienen una elevada cantidad de inmunoglobulinas y otras proteínas que pueden unirse de manera no específica y conducir a un resultado no real. Por tanto, la reducción de la adsorción inespecífica es crucial para obtener señales del blanco bajas y mejorar la sensibilidad del biosensor. Para minimizarla, varios parámetros que podrían afectar este proceso fueron optimizados. Un estudio del efecto de bloqueo por BSA y caseína fue llevado a cabo, evaluando el efecto de diferentes concentraciones (5, 10 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) de los agentes bloqueantes. La caseína bloqueó la superficie de manera más efectiva que la BSA, probablemente por su menor tamaño, consiguiendo la mejor relación señal/blanco con 20 mg mL<sup>-1</sup> de caseína. Con más bajas concentraciones de caseína, el efecto bloqueante no fue tan efectivo, mientras que con concentraciones más altas el efecto bloqueante fue excesivo, afectando negativamente a la señal analítica. Tras esta optimización, se realizó

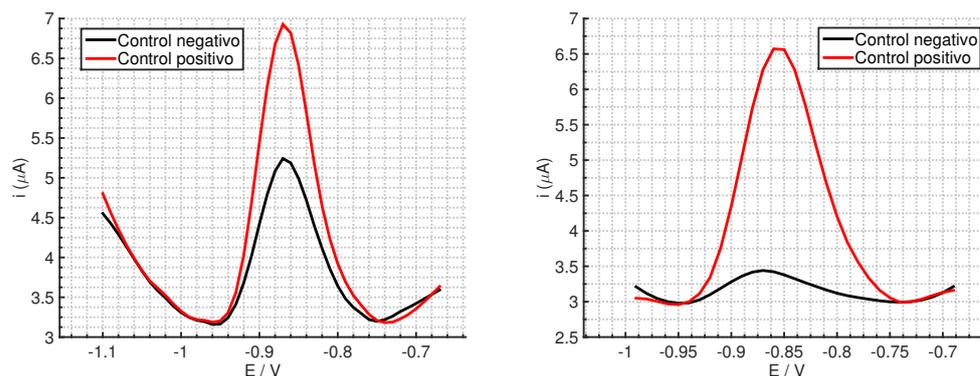


Figura 6.4: **A)** Voltamperometría de pulso diferencial de la señal analítica para los sueros positivo y negativo utilizando el inmunosensor electroquímico sin optimizar. **B)** Voltamperogramas de pulso diferencial de la señal analítica para los sueros positivo y negativo tras la optimización del inmunosensor electroquímico.

un estudio del tiempo de bloqueo. En este caso, la adsorción no específica decreció con el tiempo de bloqueo. La máxima relación señal/blanco fue obtenida con 45 min de tiempo de bloqueo. Para tiempos más altos, la unión específica se vio comprometida con el bloqueo de la superficie y disminuyó la señal analítica. Sin embargo, tras la optimización de la etapa de bloqueo, los resultados para el control negativo todavía mostraban una ligera señal, por encima de  $1 \mu\text{A}$ , mientras que para el control positivo esta señal era de  $3.7 \mu\text{A}$ . Por tanto, algún efecto de la adsorción inespecífica estaba ocurriendo, que podría ser debido a la adsorción del anticuerpo de detección (anti-H-IgG-QD). El efecto de una pequeña concentración de BSA ( $1, 5$  y  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en esta disolución fue evaluado. Con una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA, una señal de fondo considerablemente más baja que  $1 \mu\text{A}$  fue obtenida, decreciendo la adsorción no específica, como se muestra en la Figura 6.4B, y sin disminuir de manera significativa la señal para el control positivo.

### 6.3.2 Optimización de las condiciones experimentales

Algunos parámetros que afectan a la funcionalidad del biosensor fueron optimizados. Los controles séricos (positivos y negativos) de un kit ELISA comercial fueron empleados para esta optimización, y se llevó a cabo el bioensayo variando los parámetros estudiados. La concentración de tTG fue variada entre diferentes valores ( $0.01, 0.05, 0.1$  y  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y la respuesta del biosensor fue registrada. Los resultados mostraron que la concentración de tTG más apropiada fue de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Con concentraciones más bajas, la señal para

el control positivo era menor (sin un cambio apreciable en la señal del control negativo) disminuyendo la relación señal/blanco. Concentraciones más altas no mejoraron esta relación en comparación a la obtenida con  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Otros parámetros como el tiempo de incubación del suero y el tiempo de reacción y la concentración de la disolución de anti-H-IgG-QD fueron, también, optimizados. Los valores más óptimos fueron obtenidos con 60 min para ambos tiempos de incubación y una concentración de 10 nM (en términos de QDs) para la disolución de anti-H-IgG-QD. Con estos parámetros optimizados, se obtuvo el mayor valor para la relación señal/blanco.

#### 6.4 COMPORTAMIENTO ANALÍTICO DEL BIOSENSOR DE ANTICUERPOS IGG ANTI-TRANSGLUTAMINASA

##### 6.4.1 Calibración con el inmunosensor

El sensor desarrollado fue empleado con las condiciones experimentales optimizadas para establecer una relación entre la señal analítica y la concentración de anticuerpos IgG anti-tTG usando calibradores de suero humano del kit ELISA comercial (0, 3, 7, 16, 40 y 100  $\text{U mL}^{-1}$ ). La [Figura 6.5A](#) muestra la recta de calibrado para las concentraciones evaluadas de anticuerpos IgG anti-tTG. Se observó la saturación del sensor para una concentración de  $100 \text{ U mL}^{-1}$ , y por tanto, el límite superior del rango lineal fue de  $40 \text{ U mL}^{-1}$ , mientras que la concentración mínima diferenciada del blanco fue de  $7 \text{ U mL}^{-1}$ . Una relación lineal entre la corriente de pico y la concentración de anticuerpos fue obtenida de acuerdo a la siguiente ecuación:  $i (\mu\text{A}) = 0.106 \pm 0.006 [\text{anti-tTG IgG}] + 0.7 (\pm 0.1)$ ,  $R^2 = 0.994$ . La reproducibilidad entre las pendientes de las rectas de calibrado ( $n=4$ ) fue del 5.9%. Los voltamperogramas obtenidos se muestran en la [Figura 6.5B](#). El límite de detección calculado usando la recta de calibrado fue de  $2.2 \text{ U mL}^{-1}$ . De acuerdo a la especificación del kit ELISA comercial, los valores del *cutoff* para evaluar los resultados fueron los mostrados en la [Tabla 6.1](#). Por tanto, el sensor desarrollado puede diferenciar estas concentraciones clave como se ha indicado en el calibrado. Usando la recta de calibrado obtenida, se realizó la determinación de la concentración de anticuerpos IgG anti-tTG del control positivo y negativo. Para el control positivo, se estimó una concentración de  $29 \pm 1 \text{ U mL}^{-1}$ , que es consistente con los datos especificados en el kit comercial ( $30.4 \text{ U mL}^{-1}$ ). Para el control negativo, el resultado obtenido está por debajo del límite de detección del método ( $< 3 \text{ U mL}^{-1}$  indicado en los datos de calidad del kit comercial). El inmunosensor desarrollado en

| Negativo                | Positivo                 | Indeterminado            |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| $< 7 \text{ U mL}^{-1}$ | $> 10 \text{ U mL}^{-1}$ | $7-10 \text{ U mL}^{-1}$ |

Tabla 6.1: Valores clave de concentraciones de anti-tTG IgG para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

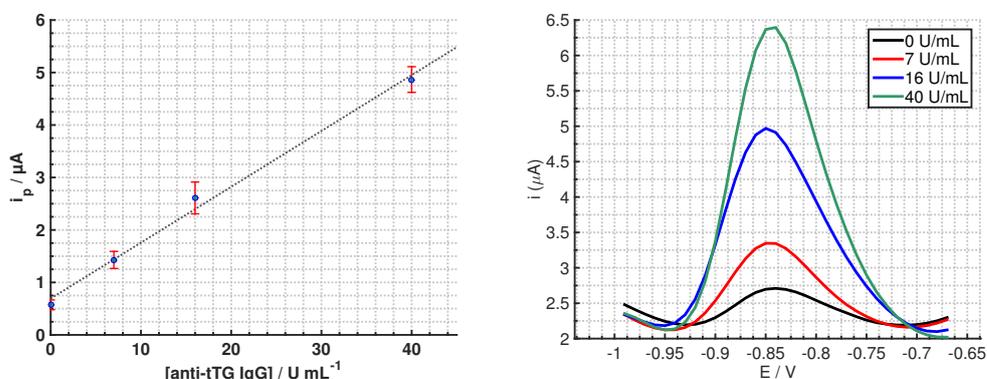


Figura 6.5: **A)** Respuesta lineal del sensor para los diferentes calibradores del kit ELISA comercial frente a diferentes concentraciones de anticuerpo IgG anti-tTG (0, 7, 16 and 40  $\text{U mL}^{-1}$ ). **B)** Voltamperogramas de pulso diferencial para los mismos calibradores del kit ELISA usando el inmunosensor electroquímico.

este trabajo presenta características similares a biosensores electroquímicos previamente publicados en la literatura. En el caso de los trabajos publicados por Neves et al.<sup>7,262</sup>, se obtuvieron rangos lineales de 0-40  $\text{U mL}^{-1}$  ó 0-100  $\text{U mL}^{-1}$  y un límite de detección de 2.95  $\text{U mL}^{-1}$ . La mayor pendiente de la recta de calibrado (y por tanto, de la sensibilidad) mostrada por esos biosensores puede ser debido a dos razones principales: el uso de una marca enzimática, que amplifica la señal analítica y el uso de electrodos serigrafados con una mayor área electródica. Sin embargo, el bioensayo consiste en una etapa más de reacción, y por tanto, la metodología es algo más compleja. Además, el gasto de mayor volumen de muestra y reactivos es otra desventaja en comparación al biosensor desarrollado en este trabajo. En el trabajo desarrollado por Dulay et al.<sup>73</sup>, en el que también se utiliza una marca enzimática, debido al uso de unidades arbitrarias en la determinación de anticuerpos, las características analíticas de los biosensores no son fácilmente comparables.

#### 6.4.2 Estudios de precisión y estabilidad

Un estudio de precisión del inmunosensor se llevó a cabo evaluando la reproducibilidad de los ensayos para los controles positivos y negativos en diferentes biosensores y

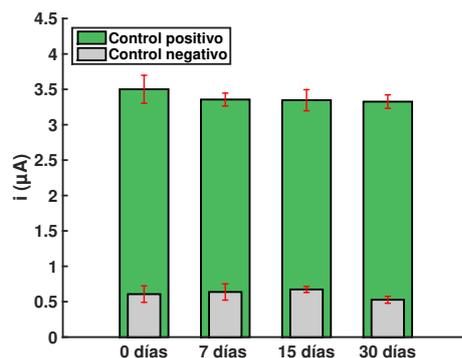


Figura 6.6: Estudio de estabilidad para el inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos IgG anti-tTG.

diferentes días. Tres medidas usando tres diferentes sensores fueron realizados cada día y los resultados obtenidos indican una buena reproducibilidad del inmunosensor, con una RSD media de 9.4 % para el suero negativo y de 4.5 % para el suero positivo. Estos resultados muestran que el método proporciona medidas precisas.

Por otro lado, también se evaluó la estabilidad del biosensor tras su fabricación mediante la adsorción física del elemento sensor. Para este estudio, varios inmunosensores fueron modificados con tTG como se describió en el procedimiento experimental (durante toda la noche a 4 °C), al día siguiente se lavaron con una disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 y se almacenaron a 4 °C por diferentes períodos de tiempo. La respuesta del biosensor fue evaluada durante un período de 1 mes usando tanto los controles séricos positivos como negativos del kit ELISA comercial. Como se muestra en la [Figura 6.6](#), no se observa ningún cambio estadísticamente significativo en la respuesta analítica del inmunosensor, por lo que se confirma que es estable por, al menos, un mes desde el día de su fabricación en estas condiciones de almacenamiento, y confirma la adsorción física como un método para mantener la estabilidad de la fase sensora.

## 6.5 BIOSENSORES SIN BLOQUEO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IGA ANTI-TRANSGLUTAMINASA

Teniendo en cuenta los problemas de adsorción no específica en las aplicaciones de biosensores y la etapa de bloqueo frecuentemente empleada en la gran mayoría de los inmunosensores electroquímicos publicados, nuestra estrategia para solucionar este problema fue mejorar la fabricación de la superficie sensora con el elemento de reconocimiento. La

celda electroquímica fue lavada completamente con la disolución reguladora de trabajo y se dejó secar a temperatura ambiente. De este modo, la superficie de toda la celda electroquímica, previamente hidrofóbica, pasa a ser hidrofílica por la presencia de sales. Los SPCEs presentan una superficie hidrofóbica debido a los componentes de la tinta utilizados en la fabricación (como resinas o polímeros orgánicos). Para generar una superficie hidrofílica, otros autores emplean pretratamientos electroquímicos que consumen largos tiempos para crear grupos oxigenados<sup>263</sup> o incluso mediante pulido con alúmina y ultrasonidos<sup>264</sup>. En este último caso, se obtiene una mejora en la inmovilización de derivados de catecol tras la activación. En esta Tesis Doctoral, la mejora hidrofílica se consigue tras el secado de moléculas de Tris en la superficie (también presentes en la disolución del elemento de reconocimiento), que incrementa la hidrofiliidad, como se ha comprobado midiendo el ángulo de contacto de una disolución de tTG (en reguladora Tris), mostrado en la [Figura 6.7](#). Una gota acuosa en una superficie hidrofóbica tiende a exhibir un ángulo de contacto alto. La forma de la gota de la disolución de tTG fue redondeada en un SPCE sin tratar con un ángulo de contacto de  $103 \pm 6^\circ$ . El ángulo de contacto se redujo a  $18 \pm 1^\circ$  tras la etapa de lavado-secado con la disolución reguladora de Tris, algo que parece indicar un contacto más íntimo entre la disolución y la superficie y que podría conducir a una mayor eficacia en el recubrimiento. La eficacia en el recubrimiento fue evaluada mediante EIS. Típicamente, la presencia de especies proteicas en la superficie electrónica aumenta la resistencia a la transferencia electrónica ( $R_{ct}$ ), ya que especies no conductoras como proteínas actúan como barrera a la ET, y esta estrategia suele ser utilizada en biosensores impedimétricos sin marca<sup>265</sup>. Los análisis por EIS de la superficie electrónica modificada de la manera convencional descrita en los apartados anteriores, de la estrategia hidrofílica descrita ahora, y de electrodos sin modificar con proteína muestran un aumento en la  $R_{ct}$  para la modificación hidrofílica ( $9521 \pm 631 \Omega$  frente a  $3935 \pm 440 \Omega$  para la modificación convencional y  $95 \pm 12 \Omega$  para SPCEs sin modificar), como se representa en la [Figura 6.8](#). El mayor valor para la  $R_{ct}$  obtenido evidencia la mayor y más efectiva carga proteica empleando esta estrategia. En comparación, parece que la hidrofobicidad de la superficie puede formar una barrera limitando el acceso de la proteína al electrodo, produciendo un recubrimiento inferior, incluso usando las mismas concentraciones, algo que dejaría una mayor superficie electrónica disponible para adsorciones inespecíficas. Por tanto, la estrategia de modificación hidrofílica aumenta la carga proteica en la superficie electrónica, que puede tener un efecto positivo en dos sentidos: mayor unión específica

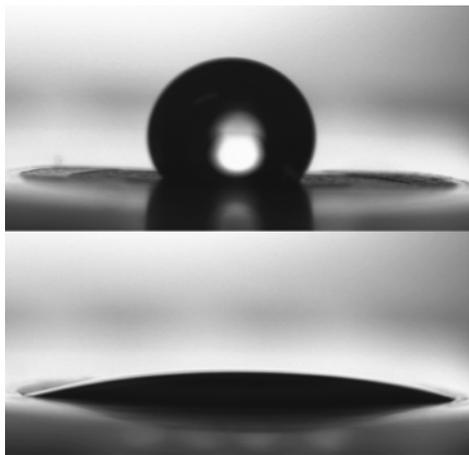


Figura 6.7: Fotografía de gotas de una disolución de tTG usando el procedimiento de modificación convencional (arriba) y la modificación hidrofílica desarrollada en este trabajo (abajo).

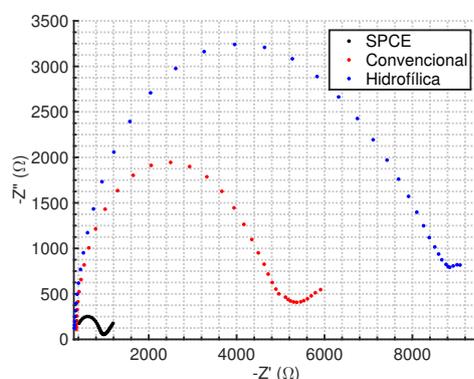


Figura 6.8: Gráficas Nyquist para medidas EIS de un SPCE sin modificar (negro), SPCE tras la modificación convencional con tTG (rojo) y SPCE tras la modificación con tTG desarrollada en este trabajo (azul).

con el analito (mayor sensibilidad) y menor capacidad de la superficie para unir especies interferentes.

A continuación, se evaluó la funcionalidad del biosensor y la efectividad de la estrategia de modificación hidrofílica. Los voltamperogramas obtenidos para los controles positivos y negativos de un inmunosensor para la determinación de anticuerpos IgA anti-tTG realizado con una etapa de bloqueo (30 min, 20 mg mL<sup>-1</sup> de BSA) y una modificación convencional del electrodo de trabajo con tTG se muestran en la [Figura 6.9A](#). Claramente, con estas condiciones una alta adsorción no específica puede observarse, indicada por la señal del control negativo usando este agente bloqueante. Por tanto, para un bloqueo de la superficie más eficiente, un mayor tiempo, una mayor concentración o un agente blo-

queante diferente deberían ser empleados. En el caso anterior, para la determinación de anticuerpos IgG anti-tTG se utilizó  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  de caseína en una etapa de bloqueo durante 45 minutos con el fin de reducir la adsorción no específica. Sin embargo, cuando se evaluó la efectividad de la nueva estrategia de modificación hidrofílica de la fase sensora, se observó una disminución significativa de la señal para el control negativo, algo que llevó a evaluar la posibilidad de eliminar la etapa de bloqueo adicional. Tras eliminar la etapa de bloqueo y usar la modificación de la celda electroquímica previamente mencionada, una señal significativa para el control negativo fue todavía obtenida (Figura 6.9B) pero la relación señal/blanco aumentó en comparación a usar BSA como bloqueante. En lugar de volver a añadir la etapa de bloqueo adicional, se evaluó la posibilidad de utilizar un agente bloqueante en las propias etapas de inmunoreacción, aprovechando alguna de esas etapas para llevar a cabo este proceso. Por tanto, se realizó un estudio de las diferentes etapas del inmunosensor con el objetivo de prevenir la adsorción no específica de los inmunorreactivos. Una pequeña cantidad de BSA (0.5 %) fue añadida a la disolución de cada etapa del inmunoensayo (control sérico, anti-H-IgA-BT y STV-QD) y el efecto en la relación señal/blanco fue estimado. No se encontraron cambios significativos cuando la BSA se añadió a las disoluciones de los controles de suero o de la STV-QDs. Sin embargo, una señal de fondo más pequeña fue encontrada cuando la BSA fue añadida a la disolución de anti-H-IgA-BT, mejorando la relación señal/blanco debido a la minimización de la adsorción no específica de este reactivo. Por tanto, la modificación del electrodo propuesta en este trabajo en combinación con la adición de una pequeña cantidad de BSA en la disolución mencionada, minimiza significativamente la adsorción no específica y mejora la relación señal/blanco, como se muestra en la Figura 6.9C. Para confirmar que los inmunorreactivos no exhiben adsorción inespecífica, SPCEs de 8 canales fueron modificados con una proteína no específica frente a los anticuerpos IgA anti-tTG (en este caso,  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  de peroxidasa del rábano silvestre, HRP) y se llevó a cabo el bioensayo con las condiciones optimizadas. En la Figura 6.9D se muestra que la señal para el control positivo no es significativamente diferente que la señal para el control negativo. Por tanto, parece que tanto el analito (anticuerpos IgA anti-tTG) como los inmunorreactivos (anti-H-IgA-BT y STV-QDs) no se adsorben inespecíficamente en la superficie electródica.

Tras el desarrollo de la metodología sin bloqueo, varios parámetros que influenciaban la funcionalidad del biosensor como la concentración de tTG, anti-H-IgA-BT y STV-QDs o los tiempos de las reacciones inmunológicas fueron optimizados. Controles séricos (positivo y negativo) de un kit ELISA comercial fueron también utilizados para esta optimización

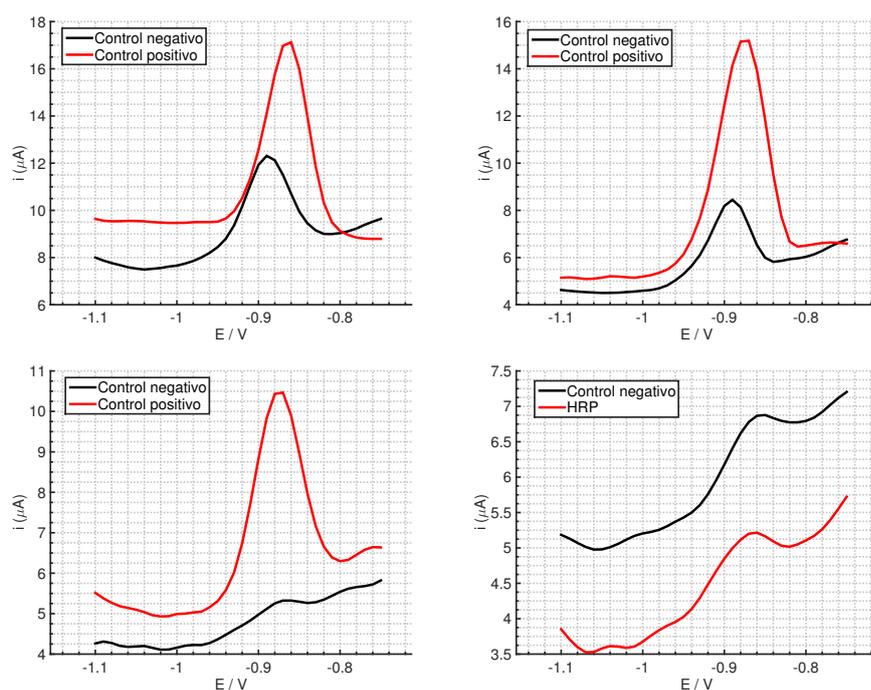


Figura 6.9: Voltamperometría de pulso diferencia de la señal analítica para los controles séricos positivo (rojo) y negativo (negro) usando el sensor electroquímico con una etapa de bloqueo (A), sin etapa de bloqueo y sin BSA (B) y sin etapa de bloqueo pero con BSA en la disolución de anti-H-IgA-BT (C). D) DPV para un control sérico negativo (rojo) y para un control sérico positivo usando HRP como elemento sensor (negro).

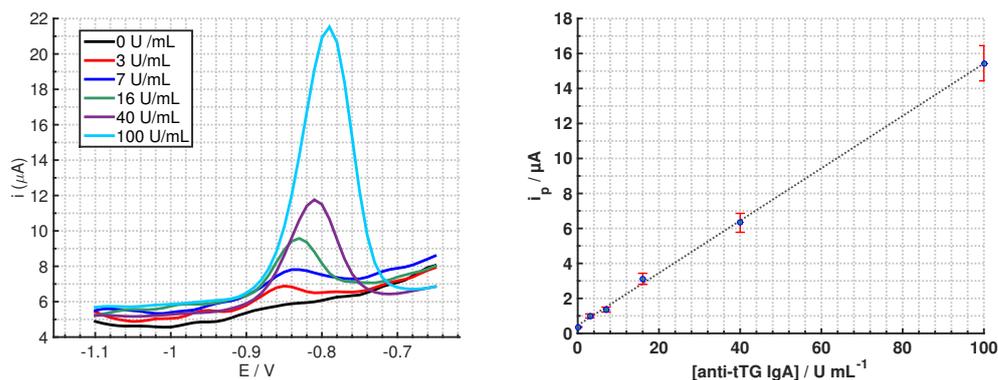


Figura 6.10: Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el inmunosensor desarrollado siguiendo el procedimiento por etapas (0, 3, 7, 16, 40, 100 U mL<sup>-1</sup> para la concentración de IgA anti-tTG).

(diluidos 1:2 en reguladora Tris), y se llevó a cabo el biosensor variando los parámetros a estudiar. Considerando la relación señal/blanco, los valores más apropiados son los descritos en la Sección 6.2.2, con los que se obtuvieron la mayor relación señal/blanco para los controles séricos. Las señales voltamperométricas para diferentes concentraciones de anticuerpos IgA anti-tTG usando los calibradores séricos del kit ELISA se muestran en la Figura 6.10. La corriente de pico de redisolución anódica aumentó con concentraciones crecientes de IgA anti-tTG, como se puede observar en la recta de calibrado de la misma figura. La señal analítica mostró una dependencia lineal para las concentraciones de IgA anti-tTG en el rango desde 3 a 100 U mL<sup>-1</sup> siguiendo la ecuación de regresión lineal:  $i_p(\mu\text{A}) = 0.142 (\pm 0.002) \cdot [\text{anti-tTG-IgA}] + 0.45 (\pm 0.09)$ ,  $R^2 = 0.9992$ . La reproducibilidad entre las pendientes de las rectas de calibrado fue de 5,5 % (RSD, n=4), mientras que el límite de detección fue de 2.4 U mL<sup>-1</sup>. De acuerdo a las especificaciones del kit ELISA comercial, los valores *cutoff* para evaluar los resultados se muestran en la Tabla 6.2. Por tanto, el sensor desarrollado es capaz de diferenciar estas concentraciones clave. Utilizando la recta de calibrado obtenida, la concentración de anticuerpos IgA anti-tTG para los controles positivo y negativo fue medida. Para el control positivo, una concentración de  $32 \pm 3$  U mL<sup>-1</sup> fue obtenida, que es bastante coherente con los datos especificados en el kit ( $26 \pm 7$  U mL<sup>-1</sup>). Para el control negativo, el resultado obtenido estuvo por debajo del límite de detección del método ( $< 3$  U mL<sup>-1</sup> según se indica en los datos del kit comercial).

Esta estrategia sin etapa de bloqueo fue también aplicada al sistema previamente desarrollado para la determinación de anticuerpos IgG anti-tTG, en la cual un procedimiento de modificación convencional de la superficie electródica y una etapa de bloqueo indivi-

| Negativo                | Positivo                | Indeterminado           |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| $< 5 \text{ U mL}^{-1}$ | $> 8 \text{ U mL}^{-1}$ | $5-8 \text{ U mL}^{-1}$ |

Tabla 6.2: Valores clave de la concentración de IgA anti-tTG para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

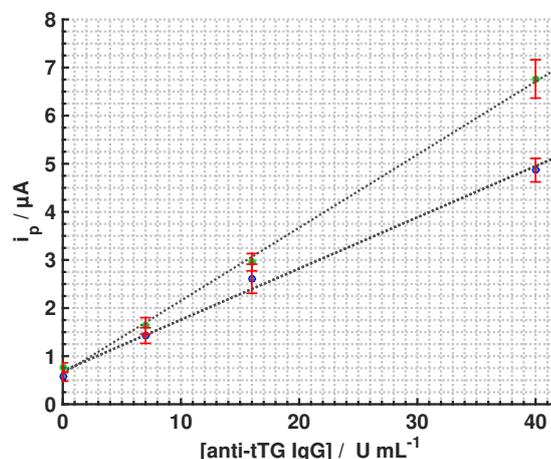


Figura 6.11: Recta de calibrado para la concentración de anticuerpos IgG anti-tTG con la etapa de bloqueo (línea de puntos) y llevado a cabo con la metodología sin etapa de bloqueo (línea discontinua).

dual fueron utilizados. Con la nueva estrategia, aunque no se consigue la detección de menores concentraciones, se consigue una mejora en la sensibilidad, estimada por las pendientes del calibrado:  $0.106 (\pm 0.006)$  para la estrategia convencional y  $0.151 (\pm 0.004)$  para la estrategia de modificación hidrofílica (Figura 6.11). Por tanto, la estrategia sin etapa de bloqueo desarrollada es capaz de eliminar una etapa del bioensayo, ahorrando un tiempo de análisis significativo (45 min) y mejorando las características analíticas del método.

## 6.6 INMUNOENSAYO DE UNA ETAPA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGA ANTI-TRANSGLUTAMINASA

Otro objetivo importante en el desarrollo de biosensores como dispositivos POC es minimizar el número de etapas de la inmunorreacción para simplificar el procedimiento experimental y evitar etapas de lavado, con el consiguiente ahorro de tiempo de análisis. Por tanto, se llevó a cabo la optimización del biosensor con el objetivo de reducir el número de etapas inmunológicas, evaluando la posibilidad de realizar la reacción entre todos los reactivos de forma simultánea (controles séricos, anti-H-IgA-BT, QDs-STV y BSA) en

la superficie del sensor y etapa de bloqueo adicional. La optimización de los parámetros afectando la relación señal/blanco como la concentración (y relación) de reactivos o los tiempos de reacción se llevó a cabo. parámetros. La mayor relación señal/blanco fue obtenida usando concentraciones de  $6.75 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el anti-H-IgA-BT,  $9.1 \text{ nM}$  para QDs-STV (en términos de QDs) y una relación 1:1.2 para los controles de suero. En este caso, el efecto de la BSA en la disolución fue ligeramente perjudicial para la relación señal/blanco, y mejores resultados fueron obtenidos sin BSA en la disolución. Es probable que la presencia de BSA en la disolución disminuya la cinética de la reacción global, ya de por sí compleja, probablemente por impedimentos estéricos. Como contratiempo de eliminar la BSA, una mayor adsorción inespecífica se puede observar. El tiempo elegido para la reacción inmunológica fue de 80 minutos. Aunque mayores tiempos mejoraban ligeramente la detección, consecuencia de una mayor reacción inmunológica, se decidió elegir 80 minutos porque era suficiente para detectar la concentración de analito de  $3 \text{ U mL}^{-1}$  y su diferenciación estadística del control negativo. Incluso con las condiciones optimizadas, la sensibilidad fue menor que para la metodología de varias etapas, y para minimizar este efecto, el tiempo de deposición fue incrementado, consiguiendo una mejor relación señal/fondo para 400 s de tiempo de deposición.

La señales voltamperométricas y recta de calibrado que se obtuvieron para diferentes concentraciones de anticuerpos IgA anti-tTG usando los calibradores séricos del kit ELISA comercial se muestran en la [Figura 6.12](#). La saturación del sensor se observa para concentraciones mayores de  $40 \text{ U mL}^{-1}$ . La relación lineal entre la corriente de pico y la concentración de anticuerpo siguió la ecuación:  $i_p(\mu\text{A}) = 0.068 (\pm 0.002) \cdot [\text{anti-tTG-IgA}] + 0.86 (\pm 0.03)$ ,  $R^2 = 0.996$ . La reproducibilidad entre las pendientes de calibrado fue de  $11.2\%$  (RSD,  $n = 4$ ), y el límite de detección de  $2.7 \text{ U mL}^{-1}$ . La menor sensibilidad y rango lineal obtenidos en comparación con la metodología de varias etapas es coherente con llevar a cabo las reacciones inmunológicas simultáneas, que resultan en una menor cinética de reacción y un mayor impedimento de la superficie electrodo resultando en una menor capacidad para llevar a cabo la reacción de reconocimiento. Sin embargo, el sensor desarrollado es capaz de diferenciar las concentraciones clínicas relevantes (previamente descritas en la [Tabla 6.2](#)) con una estrategia de una etapa y llevando a cabo 8 análisis simultáneos en menos de 90 minutos. Usando la recta de calibrado previamente obtenida, las concentraciones de anticuerpos IgA anti-tTG para el control sérico positivo y negativo fueron determinadas. Para el control positivo, se obtuvo una concentración de  $30 \pm 4 \text{ U mL}^{-1}$ , que es coherente con los datos especificados en el kit ( $26 \pm 7 \text{ U mL}^{-1}$ ). Para el control

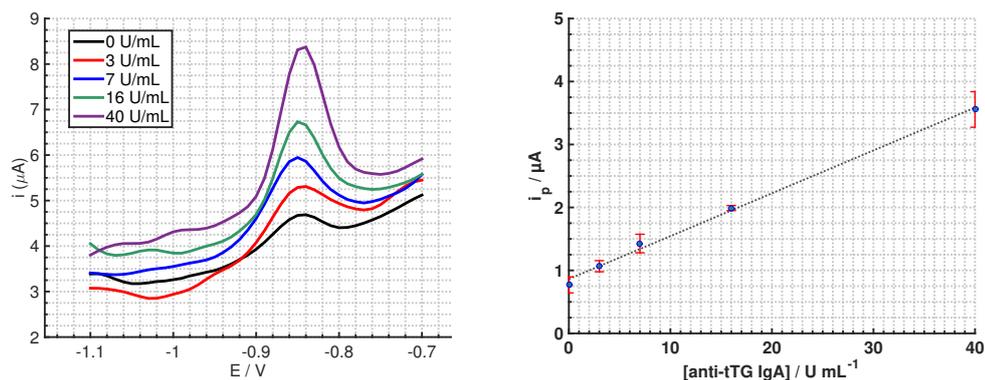


Figura 6.12: Voltamperogramas de pulso diferencial y recta de calibrado para el inmunosensor desarrollado siguiendo el bioensayo de una etapa (0, 3, 7, 16, 40  $\text{U mL}^{-1}$  para la concentración de IgA anti-tTG).

negativo, el resultado obtenido es menor que el límite de detección del método, acorde con los datos del kit comercial ( $< 3 \text{ U mL}^{-1}$ ). Estos datos son también coherentes con los resultados obtenidos para la metodología de varias etapas, confirmando que ambas metodologías pueden ser convenientes para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG en muestras de suero humano.

Un estudio de precisión del inmunosensor fue llevado a cabo evaluando la reproducibilidad en diferentes días para la medida de los controles séricos positivo y negativo. Tres medidas usando tres diferentes sensores se llevaron a cabo cada día y los resultados obtenidos indican una buena reproducibilidad del inmunosensor, con una RSD promedio de 12.1 % para los controles negativos y de 8.1 % para los controles positivos. Los resultados indican que la metodología de una etapa proporciona resultados precisos. Además, también se evaluó la estabilidad del inmunosensor tras su fabricación. Para este estudio, varios inmunosensores fueron modificados con tTG por adsorción física y almacenados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante diferentes períodos de tiempo. La respuesta del biosensor fue evaluada durante 1 mes usando los controles positivos y negativos del kit ELISA comercial. Como se indica en la [Figura 6.13](#), no se observó un cambio significativo en la respuesta analítica del inmunosensor, por lo que se puede confirmar que son estables al menos durante 1 mes bajo estas condiciones de almacenamiento.

Las características analíticas obtenidas son comparables a las obtenidas por otros inmunosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca usando plataformas de detección similares pero con mayores tiempos de análisis y con etapa de bloqueo adicional<sup>262,74,71</sup>. En otros casos, dónde se obtienen tiempos de análisis

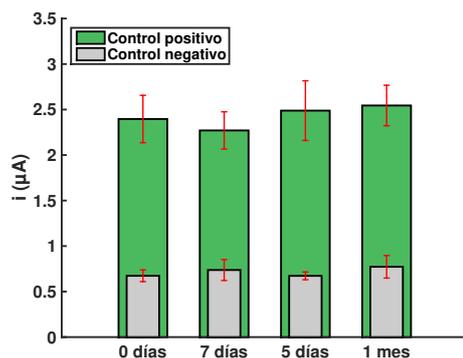


Figura 6.13: Estudio de estabilidad del inmunosensor electroquímico siguiendo el bioensayo de una sola etapa para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG.

más cortos, el procedimiento es, sin embargo, más complicado y consiste en varias etapas individuales<sup>73,76,77</sup>. Solamente una estrategia sin bloqueo fue descrita por Pividori et al.<sup>72</sup> usando electrodos compuestos de grafito-epoxy, pero llevando a cabo una metodología compleja con varias etapas de lavado de 20 min para prevenir la adsorción no específica. Por tanto, la eliminación de la etapa de bloqueo, en este caso, complica el procedimiento experimental global. El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral presenta algunas ventajas críticas frente a los inmunosensores electroquímicos publicados para la detección de anticuerpos IgA anti-tTG debido a la metodología sencilla, sin etapa de bloqueo adicional y con una sola etapa de reacción biológica.

## 6.7 CONCLUSIONES

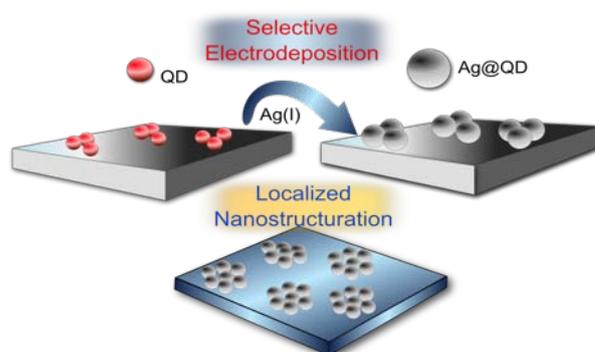
En este capítulo, biosensores electroquímicos desechables fueron optimizados y utilizados para la determinación de anticuerpos anti-tTG (biomarcadores de la enfermedad celíaca) usando la detección *in situ* de QDs en electrodos serigrafados. La detección *in situ* de QDs en la superficie de los electrodos desechables es una estrategia muy conveniente para usar este tipo de marcas electroquímicas en análisis clínicos. Numerosos trabajos han sido publicados en los que se realizan análisis de especies clínicas utilizando QDs como marca y electrodos convencionales para su detección. Estos sistemas son muy complejos para su utilización real en hospitales, además de la necesidad de limpieza de estos electrodos (y las celdas utilizadas) entre medidas para evitar posibles contaminaciones biológicas. Por tanto, los dispositivos desarrollados en este trabajo presentan ventajas como un bajo coste,

bajo volumen de reactivos necesario, ahorro de tiempo significativo por la utilización de plataformas de 8 canales y una metodología muy simple.

Tras la optimización y evaluación de del funcionamiento de un biosensor para la detección de anticuerpos anti-tTG IgG, se consigue una mejora significativa para un biosensor desarrollado para la detección de anticuerpos anti-tTG IgA. La tTG fue inmovilizada en la superficie del transductor utilizando una simple pero novedosa estrategia que consigue un recubrimiento de la superficie muy efectivo y minimiza la superficie electródica capaz de producir adsorciones inespecíficas. Como resultado, es posible el desarrollo de un inmunoensayo de una sola etapa siguiendo una metodología simple sin etapa de bloqueo adicional. El biosensor desarrollado es capaz de diferenciar las concentraciones clínicas relevantes con esta estrategia mono-etapa y de realizar 8 análisis simultáneos en menos de 90 minutos. Los buenos resultados obtenidos para los calibradores y controles séricos de un kit ELISA comercial indican que la plataforma analítica desarrollada es una herramienta válida para la determinación de biomarcadores de la enfermedad celíaca, y demuestran que la detección *in situ* de QDs como marca electroquímica de biosensores desechables en ensayos complejos tipo sandwich puede ser una estrategia muy interesante para llegar a fabricar dispositivos POC en el futuro.

# ESTUDIO ELECTROQUÍMICO Y APLICACIONES DE LA ELECTRODEPOSICIÓN SELECTIVA DE PLATA SOBRE QUANTUM DOTS

---



## 7.1 INTRODUCCIÓN

La generación de superficies nanoestructuradas funcionales es objeto de estudio en diferentes campos y el desarrollo de nuevas metodologías para fabricar este tipo de superficies es una preocupación constante. La electroquímica se ha convertido en una de las técnicas más interesantes para generar nanoestructuras localizadas mediante electrodeposición. La posibilidad de seleccionar los parámetros experimentales permite un alto control del tamaño y características de las nanoestructuras generadas. Por ejemplo, las técnicas de sonda de barrido como la microscopía electroquímica de barrido (SECM) han sido utilizadas para la generación de superficies nanoestructuradas<sup>266,98</sup>. Aunque estas técnicas permiten un gran control específico de las zonas de deposición debido a la utilización de micro o nanoelectrodos y un sistema de control piezoeléctrico, son bastante complejas y consumen un tiempo considerable si una superficie amplia necesita ser recubierta con estas

nanoestructuras localizadas. Este hecho hace que estas técnicas no sean las más adecuadas para generar superficies nanoestructuradas a gran escala o para superficies macroscópicas. Una alternativa es la utilización de electroquímica bipolar<sup>267</sup> para la deposición localizada en objetos conductores. La electroquímica bipolar ha sido empleada para generar objetos tipo Janus como microtubos de carbono o esferas de carbono vítreo modificadas con metales en uno de sus extremos<sup>268,269</sup>. Aunque útil para objetos como micropartículas, la electroquímica bipolar tampoco parece adecuada para la nanoestructuración localizada de superficies macroscópicas. Por tanto, parece que una metodología simple, rápida y de bajo coste que pudiera ser utilizada para recubrir una superficie macroscópica con nanoestructuras metálicas sólo en zonas seleccionadas no ha sido descrita. En otro sentido, la electrodeposición de plata ha sido ampliamente estudiada en diferentes superficies y condiciones experimentales<sup>270,271</sup>, y se ha encontrado que la plata puede ser electrodepositada de forma catalítica sobre nanopartículas de oro<sup>272,273</sup>.

En este capítulo se describe la electrodeposición selectiva de plata sobre QDs, proceso no estudiado hasta la fecha. Interesantemente, como se mencionó en la introducción, estos nanocristales pueden tener defectos estructurales que pueden actuar como sitios de captura de electrones y huecos, y por tanto, constituir centros de oxidación y reducción, respectivamente<sup>129,127</sup>. Las características particulares de la plata nanoestructurada así obtenida fueron estudiadas mediante técnicas electroquímicas y microscópicas. Por un lado, se observa como los QDs son capaces de catalizar la reducción de plata, y por otro lado, se observa una fuerte adsorción de la plata electrodepositada en la superficie de los QDs, indicado por los dos procesos de reoxidación obtenidos. A continuación se estudió los procesos de nucleación y crecimiento de las AgNPs depositadas sobre los QDs y sobre un electrodo serigrafado de carbono. Los análisis mediante microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) permiten complementar las técnicas electroquímicas para conocer en mayor medida el proceso y las características de las nanopartículas generadas. Utilizando unas condiciones de electrodeposición por debajo de la saturación y diferentes patrones de modificación de la superficie, se evalúa la capacidad de la electrodeposición selectiva de plata sobre QDs como técnica para generar superficies nanoestructuradas localizadas. Por último, se utiliza este método como prueba de concepto para la determinación de QDs, hecho que puede ser de interés para su empleo como marca de biosensores.

## 7.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 7.2.1 Detección electroquímica de quantum dots

Brevemente, el procedimiento para la detección electroquímica de quantum dots usando la electrodeposición selectiva de plata se realiza de la siguiente manera: QDs son adsorbidos en la superficie electródica colocando una gota de 10  $\mu\text{L}$  en el electrodo de trabajo. El tiempo de adsorción máximo fue de 30 min y la señal analítica no aumentó con tiempos mayores, incluso dejando la gota *overnight* a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Tras el lavado con  $\text{H}_2\text{O}$ , una gota de 40  $\mu\text{L}$  de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  en  $\text{NH}_3$  1 M fue añadida al electrodo serigrafiado, y un potencial de -0.2 V fue aplicado durante 60 s para llevar a cabo la electrodeposición. Un potencial de +0.8 V fue aplicado durante 15 s justo antes de la electrodeposición con el objetivo de disminuir la corriente capacitiva y obtener un pico de redisolución con mejor forma. La redisolución de la plata depositada se llevó a cabo mediante voltamperometría de pulso diferencial con un barrido entre +0.2 y +0.7 V con los siguientes parámetros optimizados: 0.1 V para la amplitud de pulso, 0.01 V para el escalón de potencial, 0.03 s para el tiempo de pulso, 0.1 s para el tiempo de intervalo y 5 s como tiempo de equilibración.

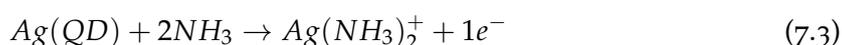
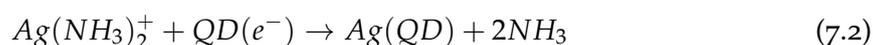
## 7.3 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA ELECTRODEPOSICIÓN DE PLATA SOBRE QUANTUM DOTS

Como la electrodeposición de plata sobre electrodos modificados con QDs no había sido descrita hasta la fecha, se llevó a cabo un extenso estudio electroquímico. En primer lugar, se llevó a cabo la voltamperometría cíclica de una disolución de plata sobre electrodos serigrafiados de carbono sin modificar y modificados con quantum dots. Como se muestra en la [Figura 7.1](#), el comportamiento electroquímico de plata sobre electrodos modificados con quantum dots es muy diferente al comportamiento sobre electrodos de carbono sin modificar. Los típicos procesos observados para la electrodeposición de plata y su redisolución se encuentran a -0.5 V y +0.05 V, respectivamente. Sin embargo, nuevos procesos anódicos y catódicos aparecen en los voltamperogramas cuando quantum dots están presentes en la superficie electródica. Estos procesos pueden ser visualizados de manera más eficaz en experimentos de voltamperometría de barrido lineal considerando solamente las curvas catódica o anódica como se muestra en la [Figura 7.2](#). En primer lugar, la LSV de la reducción/deposición fue llevada a cabo ([Figura 7.2A](#)). Como se muestra en la figura, para un

electrodo sin QDs, ocurre un solo proceso de reducción a un potencial cercano a  $-0.5$  V, típico de la electrodeposición de plata en superficies de carbono, como se ha mencionado. Para el electrodo modificado, un nuevo proceso de reducción aparece a un potencial de  $-0.05$  V. Este proceso no aparece sobre los electrodos sin modificar, o cuando se realiza LSV solamente con el electrolito de fondo ( $\text{NH}_3$  1 M) a un electrodo modificado con QDs. Por tanto, este proceso involucra plata y quantum dots, y se comporta de manera muy similar a la deposición *underpotential* de un metal sobre una superficie metálica<sup>274</sup>, que sugiere la adsorción de una monocapa del producto de la reacción. La reducción de plata es catalizada por la presencia de QDs en la superficie electródica, y se lleva a cabo con la aplicación de un menor sobrepotencial que para la reducción normal. Por otro lado, se realizó un estudio de LSV de los procesos de redisolución tras la electrodeposición aplicando un potencial de  $-0.2$  V durante 60 s (Figura 7.2B). De la misma manera que para los procesos de reducción, se encontraron diferencias significativas. Como se muestra en la figura, para un electrodo serigrafado sin modificar, solamente aparece el proceso de redisolución típico de la plata sobre carbono a  $+0.05$  V. Sin embargo, cuando los electrodos son modificados con QDs, un nuevo proceso a  $+0.45$  V es observado en el voltamperograma. Este proceso indica una fuerte interacción de la plata con los QDs, que resulta en una redisolución más difícil (mayor sobrepotencial) que para la reoxidación de plata sobre carbono. Este hecho es significativamente diferente a casos similares donde se ha descrito la electrodeposición de plata sobre nanopartículas de oro o cobre. En estos casos, solamente un proceso de redisolución aparece, sugiriendo que la interacción de la plata depositada y los quantum dots es mucho más fuerte que en estas otras nanopartículas metálicas.

Aunque el intercambio catiónico entre metales dentro de la estructura de QDs y metales en disolución ha sido previamente descrito<sup>275</sup>, incluso a temperatura ambiente<sup>276</sup>, este hecho no parece ocurrir en las condiciones experimentales y escala de tiempo de este experimento. Si el intercambio catiónico ocurriera, la plata iónica sería introducida en la estructura de la nanopartícula y estaría fuertemente combinada con los ligandos (probablemente con el sulfuro, que se encuentra en la capa externa de la nanopartícula). Por tanto, la reducción de plata introducida en la nanopartícula sería más difícil (necesitaría un mayor sobrepotencial) que la deposición normal y ocurriría a un potencial más negativo. El hecho de que la reducción de plata que interacciona con los QDs ocurre a un potencial más positivo que la reducción normal significa que la plata iónica no interacciona fuertemente con las nanopartículas antes de la reducción. Bard et al. describieron que los QDs podrían involucrarse en transferencias multielectrón a un potencial dado debido

a la captura de electrones dentro de la partícula, según se explicó en la introducción<sup>129</sup>. Este hecho coincide con la respuesta electroquímica encontrada para la electrodeposición de plata sobre QDs. Debido al barrido de potencial, los QDs pueden estar aceptando y capturando electrones en su estructura, que son transferidos a los iones Ag(I) cercanos a las nanopartículas y produciendo su reducción. Lisdat et al. describieron que QDs de CdSe/ZnS podían causar la reducción de ferrocianuro en disolución tras la aplicación de pulsos de luz<sup>277</sup>. No es irracional pensar que un proceso similar podría estar ocurriendo en este caso, donde los QDs son excitados por una transferencia electrónica desde el electrodo (o directamente por la luz ambiente) y los electrones de los niveles excitados podían ser transferidos a la plata para su reducción. El ferrocianuro tiene un potencial de reducción relativamente cercano a la reducción de plata, y por tanto, podía ocurrir un proceso similar. Tras la deposición de plata, se observa una fuerte interacción entre la superficie de la nanopartícula y la plata electrodepositada como indica el alto sobrepotencial de la redisolución. Este hecho se debe, probablemente, a que por el pequeño tamaño de los QDs, los procesos superficiales se encuentran realmente realizados debido a la alta relación superficie/volumen, algo que se traduce en una fuerte adsorción. Se propone el siguiente mecanismo para la reducción de plata y los procesos de oxidación donde intervienen los QDs:



Con el objetivo de evaluar la etapa limitante de la velocidad de los diferentes procesos electroquímicos, se registraron curvas LSV a diferentes velocidades de barrido. En la [Figura 7.3](#) se muestra el efecto de la velocidad de barrido en los procesos anódicos y catódicos. La relación lineal entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para los procesos de reducción indican que la etapa limitante de la electrodeposición está controlada por la difusión (transferencia de masa de iones  $Ag(NH_3)_2^+$  a la superficie electrodo), confirmando que el intercambio catiónico no ocurre. Aunque se podría esperar

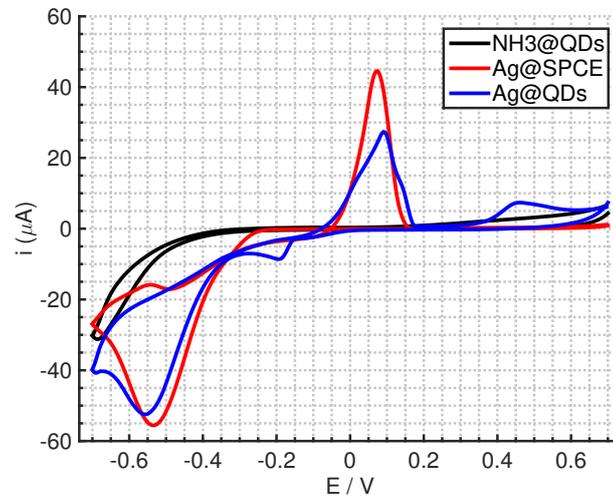


Figura 7.1: Voltamperometría cíclica de plata en un SPCE modificado con QDs (línea azul), en un SPCE sin modificar (línea roja) y CV de  $\text{NH}_3$  en un SPCE modificado con QDs (línea negra).

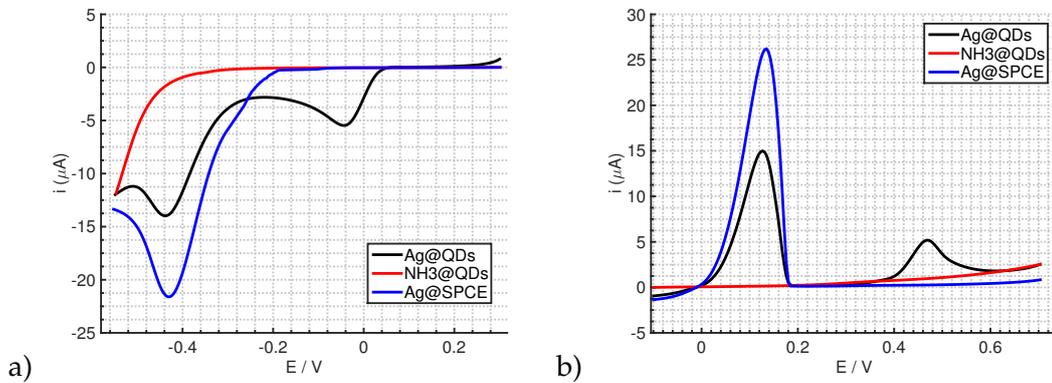


Figura 7.2: a) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.3 a -0.55 V para  $\text{NH}_3$  en un SPCE modificado con QDs (rojo), 250  $\mu\text{M}$  de plata en un SPCE (azul) y 250  $\mu\text{M}$  de plata en un SPCE modificado con QDs (negro). b) Voltamperometría de barrido lineal desde -0.1 a +0.7 V de las mismas disoluciones tras la electrodeposición aplicando -0.2 V durante 60 s.

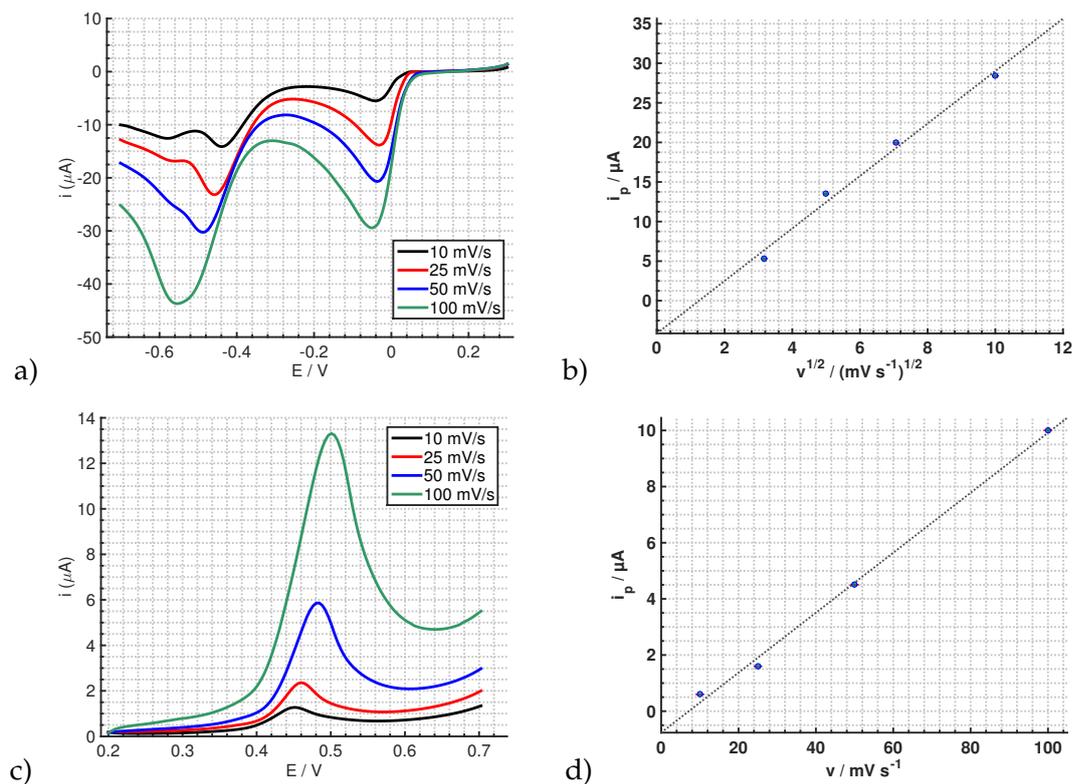


Figura 7.3: A) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.25 a -0.7 V de 250  $\mu\text{M}$  de plata a diferentes velocidades de barrido (10, 25, 50, 100  $\text{mV s}^{-1}$ ) para SPCEs modificados con QDs. B) Relación entre la corriente de pico del proceso a -0.05 V y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. C) Voltamperometría de barrido lineal desde +0.2 a +0.7 V de 50  $\mu\text{M}$  de plata a diferentes velocidades de barrido (10, 25, 50, 100  $\text{mV s}^{-1}$ ) para SPCEs modificados con QDs tras la electrodeposición aplicando -0.1 V durante 60 s. D) Relación entre la corriente de pico del proceso a +0.45 V y la velocidad de barrido.

un proceso controlado por adsorción (ya que el producto de esta reducción es fuertemente adsorbido), parece que es un proceso cinéticamente rápido en comparación a la transferencia de masa. Para estudiar los procesos de redisolución, se llevó a cabo la electrodeposición de plata (-0.1 V, 60 s, 250  $\mu\text{M}$ ) antes de realizar los voltamperogramas. La relación lineal entre la corriente de pico y la velocidad de barrido indica que la etapa limitante para los procesos de redisolución es controlada por la adsorción. La gran diferencia encontrada en el potencial de pico de la deposición normal sobre carbono y la deposición sobre los QDs sugiere una fuerte adsorción de la plata elemental en la superficie de los QDs.

Un control de los parámetros de deposición (potencial y tiempo de deposición y la concentración de plata iónica) permite obtener unas condiciones experimentales en las que se produce la deposición selectiva de plata en los quantum dots en lugar de en toda la

superficie electródica. Se llevó a cabo un estudio de diferentes tiempo de deposición. La electrodeposición se realizó en una disolución de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ag(I)}$  en  $\text{NH}_3$  1 M y tras aplicar -0.1 V durante diferentes tiempos. Electrodo modificados con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 10 nM de QDs fueron utilizado. En la [Figura 7.4](#) se muestra el claro efecto del tiempo de deposición en los procesos de redisolución. A bajos tiempos de deposición, solamente el proceso de redisolución a +0.45 V aparece, y la corriente de pico crece con el tiempo de deposición. A 120 s, una pequeña corriente de pico aparece a 0.05 V, indicando que los sitios activos de los QDs ya se encuentran saturados de plata. A mayores tiempos de deposición, la corriente de pico del proceso a 0.05 V experimenta un aumento significativo debido a que la plata depositada tras la saturación de los QDs no muestra ninguna diferencia a la plata depositada sobre la superficie de carbono, es decir, no se observa una interacción específica con los QDs tras la saturación. La corriente de pico a +0.45 V deja de aumentar a tiempos de deposición altos, hecho que también indica la saturación. El efecto del tiempo de electrodeposición fue también evaluado por microscopía confocal. SPCEs modificados con QDs fueron analizados antes y después de llevar a cabo la electrodeposición de plata en las mismas condiciones que el estudio voltamperométrico pero durante diferentes tiempos (0, 5, 15 y 30 s). Una alta fluorescencia se observa en el electrodo en ausencia de plata como se ilustra en la [Figura 7.5](#). Esta fluorescencia decrece considerablemente con tiempos de electrodeposición crecientes. Para 30 s (y valores superiores), no se observa fluorescencia de la superficie electródica. Este hecho apunta a que incluso a tiempos donde la saturación electroquímica no está todavía ocurriendo (tiempos menores de 120 s como se muestra en la [Figura 7.4](#)), la plata ya está recubriendo toda la superficie de los QDs y la fluorescencia es impedida. Estos estudios muestran que la deposición selectiva de plata solamente sobre los QDs puede llevarse a cabo controlando los parámetros de deposición. Por tanto, nanoestructuras de plata localizadas podrían ser generadas solamente en zonas del electrodo donde existen QDs. Además, dependiendo de la cantidad de plata y QDs depositados, el tamaño o densidad superficial de las nanopartículas generadas pueden ser ligeramente controlados.

La estructura de las nanopartículas generadas fue estudiada mediante la obtención de imágenes de TEM de alta resolución (HRTEM) de una rejilla recubierta de carbono. Esta rejilla fue modificada con 2  $\mu\text{L}$  de una disolución 10 nM de QDs hasta secado. La electrodeposición fue llevada a cabo in situ en la rejilla usando 5  $\mu\text{L}$  de una disolución de 50  $\mu\text{M}$  de Ag (en  $\text{NH}_3$  1 M) tras aplicar 0 V durante 1 s. Una rejilla modificada con QDs (sin electrodepositar plata) fue utilizada para comparación. El sistema para llevar a cabo

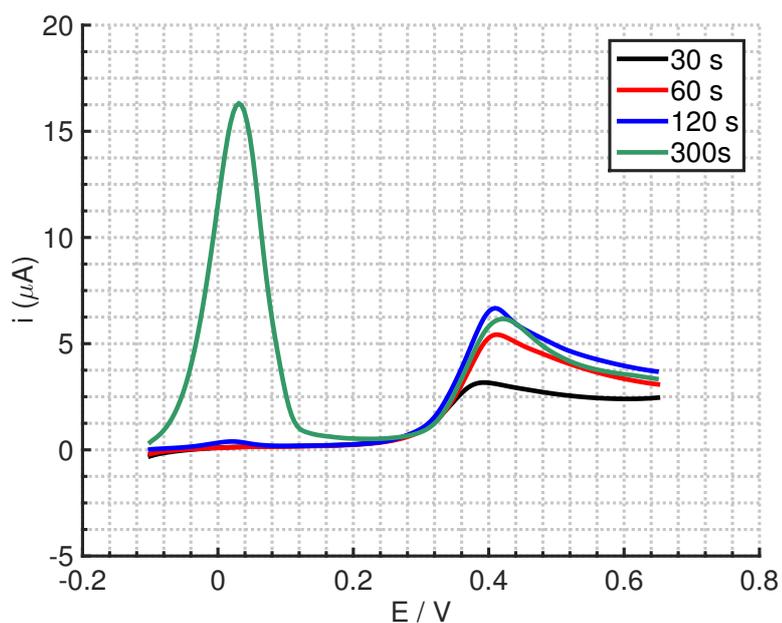


Figura 7.4: Voltamperometría de barrido lineal entre -0.1 y +0.7 V de 50  $\mu\text{M}$  de plata tras la electrodeposición aplicando -0.1 V durante diferentes tiempos (30, 60, 120, 300 s) en electrodos modificados con QDs.

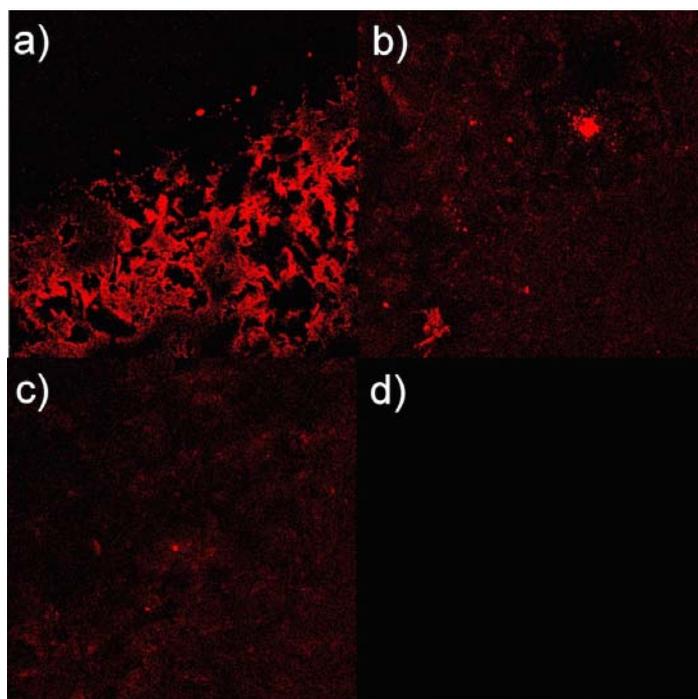


Figura 7.5: Imágenes de microscopía confocal de electrodos serigrafiados modificados con QDs en diferentes condiciones de electrodeposición de plata (-0.1 V): a) sin electrodepositar, b) durante 5 s, c) durante 15 s, d) durante 30 s.

la electrodeposición en esta rejilla se describe en el [Capítulo 2](#). Imágenes de HRTEM diferentes se obtienen para la rejilla modificada con QDs tras la electrodeposición de plata en comparación al control. La [Figura 7.6](#) muestra estas imágenes en las que se observan QDs sin modificar con una estructura monocristalina y quasi-esférica con un tamaño global entre 10-15 nm. Tras la electrodeposición, se observan estructuras más heterogéneas, pero típicamente, incorporan dos fases diferenciadas como también se muestra en la [Figura 7.7](#), en imágenes obtenidas con una menor magnificación. Por un lado, se observa una fase con una estructura similar a la de los QDs sin modificar, pero aparece una nueva fase más oscura policristalina, que se atribuye a la plata. En la mayoría de las nanopartículas, la plata es preferencialmente localizada en una de las zonas laterales de los QDs formando nanopartículas tipo Janus<sup>1</sup>, aunque en algunos casos está recubriendo casi por completo los QDs. Este hecho indica que la plata comienza a crecer preferencialmente en alguna zona del QD y continúa creciendo sobre toda la nanopartícula. Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) fue llevada a cabo a estas muestras en el modo de barrido del TEM (STEM) para confirmar el material de las diferentes fases observadas en las imágenes. Aunque las medidas por STEM no permiten una resolución tan alta como HRTEM, se encontró una clara diferencia en la composición de las diferentes fases, confirmando que la fase más oscura está compuesta prácticamente de Ag recubriendo los QDs (ya que el análisis también mostró la presencia de S y Se en estas áreas). S y Se fueron los elementos elegidos para confirmar la presencia de los QDs debido a la interferencia entre Cd/Ag y Zn/Cu (siendo Cu el principal material de la rejilla). La [Figura 7.8](#) muestra el perfil EDX de las nanopartículas tipo Janus. Se percibe como la Ag es preferiblemente localizada en el área lateral de los QDs, mientras que en el extremo opuesto, aunque también se detecta Ag, la contribución a la composición global es menor.

Un posible esquema de la deposición selectiva en función del tiempo se muestra en la [Figura 7.9](#). A tiempos más bajos, la plata reducida se deposita en la superficie de los QDs formando una partícula tipo Janus hasta que la cantidad de plata satura toda la superficie de los QDs. Considerando el tamaño de los QDs (alrededor de 10-15 nm) y el tamaño de las nanopartículas de plata mostradas en las imágenes SEM tras la deposición selectiva (hasta algo más de 100 nm, dependiendo de las condiciones), el efecto catalítico de los QDs ocurre incluso con una estructura multicapa de plata sobre ellos. Tras la saturación, dos situaciones podrían ocurrir: la plata reducida se deposita en la superficie de carbono

---

<sup>1</sup> Partículas tipo Janus, son partículas que presentan dos zonas diferenciadas con propiedades físicas o químicas distintas.

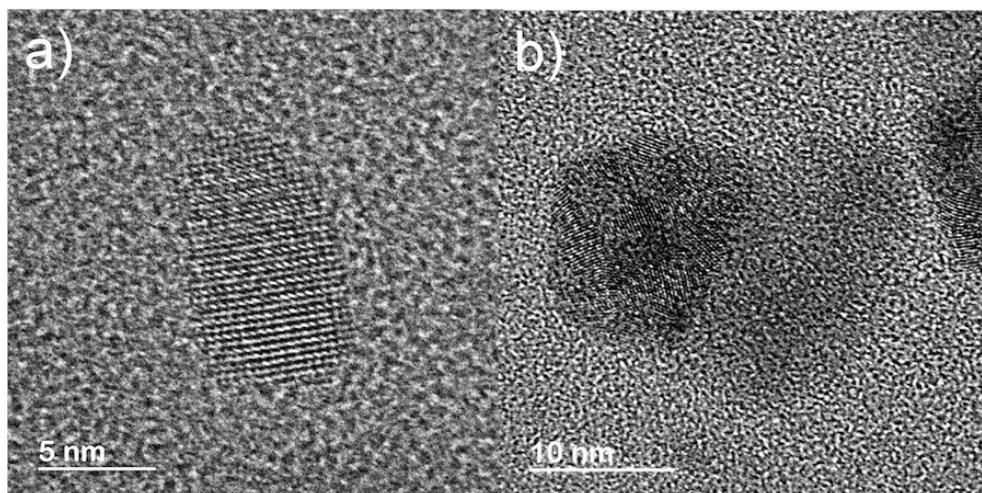


Figura 7.6: Imagen TEM de los QDs utilizados en este trabajo (a), y (b) de QDs tras la electrodeposición de plata en la rejilla de TEM.

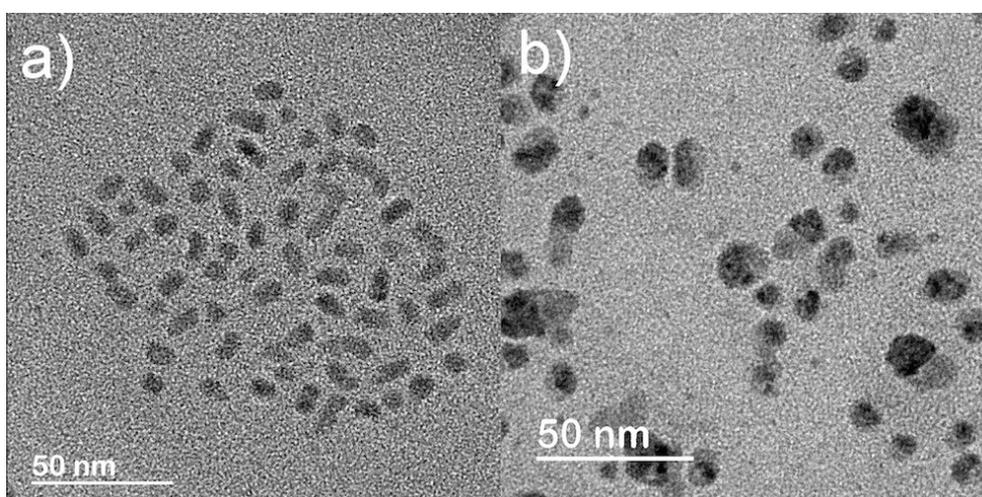


Figura 7.7: Imagen de TEM de QDs (a) y Ag@QDs (b) a una menor magnificación.

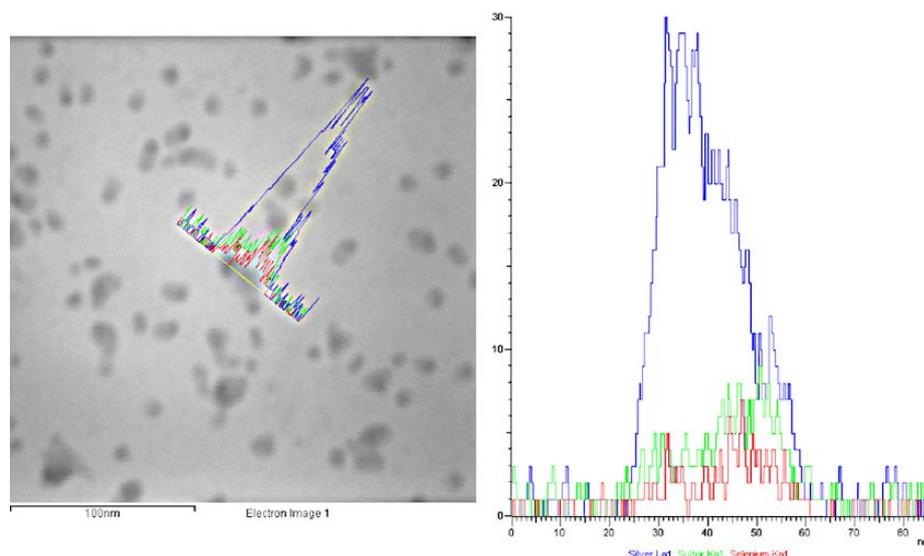


Figura 7.8: Perfil de STEM y EDX obtenidos para las Ag@QDs generadas tras la electrodeposición de plata sobre la rejilla de TEM.

o sobre el recubrimiento de plata de los QDs. Dos tipos de partículas de plata son observadas en las imágenes de SEM cuando la electrodeposición se lleva a cabo tras la saturación, indicando dos tipos de nucleación y crecimiento y confirmando que la deposición sobre la superficie de carbono también ocurre. Si la deposición de plata sobre los QDs saturados de plata también ocurriera (como es probable), no se observan diferencias termodinámicas o cinéticas entre las dos situaciones en las medidas electroquímicas. Por otro lado, cuando la deposición de plata se lleva a cabo con condiciones extremas (tiempos de deposición muy altos y/o potenciales de deposición muy negativos), parece que el proceso de redisolución de plata a +0.45 V tiende a decrecer en algunos casos de una manera irreproducible. Este hecho sugiere que la deposición de plata sobre el recubrimiento de plata de los QDs también ocurre, y el efecto de la adsorción de la plata sobre los QDs en el proceso de redisolución es impedido (probablemente por un número elevado de capas de recubrimiento).

La selectividad de la electrodeposición sobre QDs de otros metales solubles en un medio  $\text{NH}_3$  1 M como Co(II), Ni(II) y Cu(II) fue evaluada. En la [Figura 7.10](#) se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para disoluciones de 250  $\mu\text{M}$  de estos metales en electrodos serigrafados modificados con QDs y sin modificar. Las CVs para Co(II) y Ni(II) muestran los mismos procesos en ambos electrodos. Para Co(II), se observan dos procesos catódicos, el primero pico ancho atribuido a la ORR (como se pudo comprobar en una me-

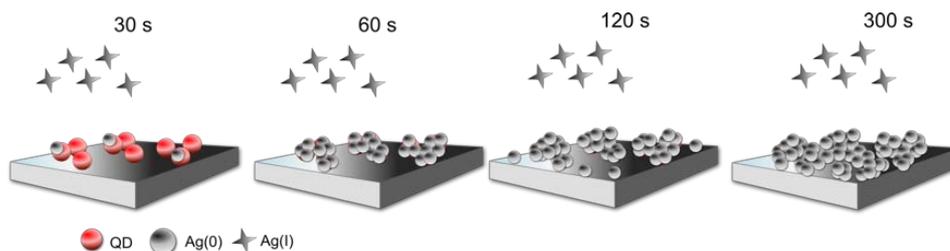


Figura 7.9: Posible esquema de la electrodeposición de plata en un electrodo modificado con QDs a diferentes tiempos de deposición.

cida del blanco), y un pico más agudo a un potencial de  $-1.1$  V, atribuido a la reducción de  $\text{Co(II)}$  a  $\text{Co(o)}$ . Dos procesos anódicos son observados en la curva inversa, atribuidos a la oxidación de  $\text{Co(o)}$  a  $\text{Co(II)}$  y  $\text{Co(II)}$  a  $\text{Co(III)}$ , respectivamente. Para el  $\text{Ni(II)}$ , se observan también dos procesos catódicos, el primero a un potencial más positivo que corresponde a la ORR y un pequeño proceso cercano a la HER que corresponde a la reducción de  $\text{Ni(II)}$  a  $\text{Ni(o)}$ . En este caso, sólo un pico anódico se puede observar, la oxidación de  $\text{Ni(o)}$  a  $\text{Ni(II)}$ . Parece como algún proceso que no está bien resuelto puede ocurrir cercano a la reacción de evolución del oxígeno (como se puede ver por el incremento de corriente), que podría atribuirse a la oxidación de  $\text{Ni(II)}$  a  $\text{Ni(III)}$  que suele ocurrir en medios alcalinos<sup>278</sup>, pero no se observa con la suficiente resolución para confirmarlo. El comportamiento de  $\text{Zn(II)}$  fue también evaluado, pero no mostró ningún proceso entre  $-1.3$  V y  $+0.8$  V. Este hecho indica que la presencia de los QDs en la superficie electródica no afecta a la transferencia electrónica desde el electrodo al metal y no se observa de manera electroquímica una interacción particular del metal con el QD. Para el  $\text{Cu(II)}$ , varios procesos son observados ya que la especie  $\text{Cu(I)}$  puede formarse en un medio de  $\text{NH}_3$ . Aunque el mismo número de procesos se pueden observar en ambos electrodos, existen algunas diferencias en los potenciales y corrientes de pico. Los procesos catódicos pueden ser atribuidos a las siguientes reducciones:  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$ ,  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(o)}$ , que probablemente estén cercanos al potencial de la ORR. Interesantemente, el proceso de oxidación al potencial más positivo, que se atribuye a la oxidación de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(II)}$  está enormemente amplificado (corriente de pico unas 20 veces mayor) en presencia de QDs. Probablemente, las especies de  $\text{Cu(I)}$  generadas en el barrido de oxidación pueden ser estabilizadas por los QDs y no sufren un proceso de dismutación a  $\text{Cu(o)}$  y  $\text{Cu(II)}$ , como parece que ocurre en un electrodo sin modificar, en el cual el proceso de oxidación de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(II)}$  prácticamente no se observa (y el proceso de reducción de  $\text{Cu(I)}$  a  $\text{Cu(o)}$  también es menor). Sin embargo, este proceso no parece ser una electrodeposición selectiva de  $\text{Cu}$  sobre los QDs (aunque es

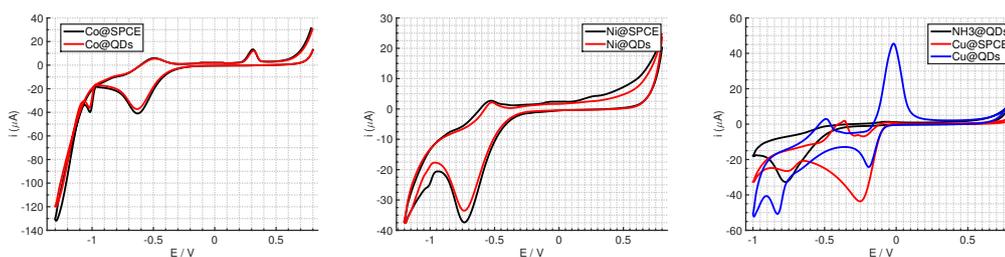


Figura 7.10: Respuesta voltamperométrica de Co(II), Ni(II) y Cu(II) en electrodos modificados con QDs y sin modificar.

un proceso muy interesante de estudiar en mayor profundidad). Por tanto, de acuerdo al mecanismo que se propone (los QDs atrapan electrones y los transfieren a los iones Ag(I) que se encuentran en una zona cercana a los QDs), la alta selectividad de la plata en este proceso es posiblemente dado por la energía que los electrones de los QDs son capaces de donar al metal (la reducción de la plata ocurre a menor potencial que para los otros metales evaluados). Sin embargo, la confirmación de este mecanismo necesitaría de estudios teóricos/fundamentales adicionales al trabajo descrito aquí.

#### 7.4 NUCLEACIÓN DE PARTÍCULAS DE PLATA SOBRE QUANTUM DOTS

La nucleación de partículas de plata sobre electrodos modificados con quantum dots y sin modificar fue estudiada. En la [Figura 7.11](#) se muestran imágenes realizadas por SEM de superficies funcionalizadas, fabricadas usando electrodos modificados con QDs y sin modificar y llevando a cabo la electrodeposición de plata en las mismas condiciones experimentales (-0.2 V, 60 s, 250  $\mu\text{M}$  of Ag(I)). Para los electrodos sin modificar con QDs, se obtuvieron microestructuras de plata en forma de flor con un tamaño entre 1-2  $\mu\text{m}$ . Para los electrodos modificados con QDs, nanopartículas de plata quasi-esféricas con un tamaño relativamente homogéneo alrededor de 200 nm fueron obtenidas. Estos resultados evidencian de una manera visual, que dos formas diferentes de nucleación y crecimiento de las partículas se producen en los electrodos modificados y sin modificar. La nucleación y crecimiento de las partículas de plata fueron estudiadas analizando las corrientes transitorias (i-t) en un experimento cronoamperométrico y ajustando los datos experimentales al modelo teórico desarrollado por Scharifker y Hills<sup>222</sup>, y descrito anteriormente. El potencial del electrodo fue variado desde un potencial a circuito abierto a diferentes potenciales para producir la electrodeposición de plata: -0.2, -0.4, -0.5 y -0.6 V. En los elec-

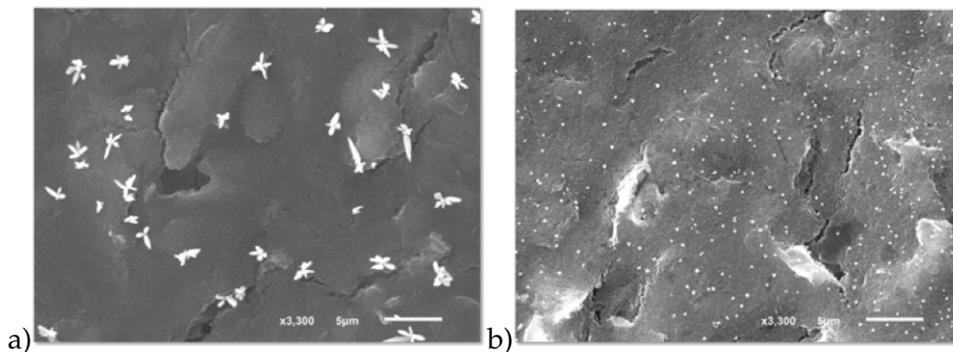


Figura 7.11: Imágenes SEM para a) SPCEs sin modificar y b) SPCEs modificados con QDs tras la electrodeposición de plata bajo las mismas condiciones experimentales

trodos modificados, a la superficie electródica se añadió 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 10 nM de QDs para su adsorción. El modelo de Scahrifker-Hills ha sido ampliamente utilizado para analizar la nucleación y crecimiento de metales electrodepositados<sup>279</sup>. Como se observa en la [Figura 7.12](#), los resultados experimentales para la electrodeposición de plata a diferentes potenciales en los electrodos de carbono siguieron bastante bien el modelo teórico para una nucleación instantánea, indicando un crecimiento lento de los núcleos en un pequeño número de sitios activos. Sin embargo, en los electrodos modificados con QDs, los resultados experimentales siguieron el modelo teórico para una nucleación progresiva, que corresponde a un rápido crecimiento de núcleos en muchos sitios activos. Estos datos concuerdan perfectamente con las imágenes SEM obtenidas, donde un mayor número de sitios activos se observan para los electrodos modificados con QDs. Aunque, teóricamente, el modelo progresivo genera una mayor dispersión de tamaños, en las imágenes SEM se muestra una relativa homogeneidad en el tamaño de las nanopartículas de plata generadas sobre los QDs. Este hecho puede deberse a que, según el mecanismo propuesto en este trabajo, la plata es reducida mediante una transferencia electrónica desde los QDs a los iones  $\text{Ag}^+$  en disolución, por lo que sería una transferencia energética similar en todos los casos. Esto resulta en que, de manera independiente al potencial aplicado, la reducción de plata sobre los QDs se realiza con una energía y mecanismo similar. Normalmente, si se utiliza un sobrepotencial bajo para llevar a cabo la electrodeposición, las capas de difusión son menores, y por tanto, la posibilidad de acoplamiento entre capas vecinas puede ser menor, algo que resulta en una mayor homogeneidad de tamaños.

La [Tabla 7.1](#) muestra la densidad poblacional estimada de los núcleos de plata depositados a un potencial de -0.2 V para SPCEs sin modificar y modificados con QDs. De acuerdo con el modelo teórico, un mayor número de sitios activos fueron calculados para

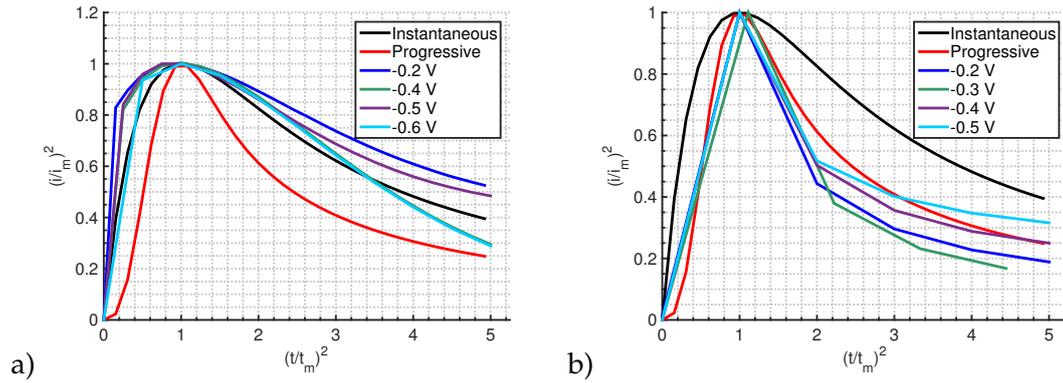


Figura 7.12: Respuesta  $i$ - $t$  transitorias del modelo Scharifker-Hills para la electrodeposición de plata en a) SPCEs sin modificar y b) SPCEs modificados con QDs.

|                                      | SPCEs             | Ag@QDs            |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| $N_0$ (partículas $\text{cm}^{-2}$ ) | $3.8 \times 10^5$ | $8.1 \times 10^8$ |

Tabla 7.1: Densidad de población de núcleos estimada para la electrodeposición de plata a  $-0.2$  V para SPCEs sin modificar y modificados con QDs

la nucleación progresiva como la que se produce en los electrodos modificados. Como el proceso de redisolución es controlado por la adsorción, la ecuación 7.4 puede ser utilizada con los datos obtenidos en los estudios voltamperométricos tras integrar la carga para estimar la cantidad de plata adsorbida sobre los QDs:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (7.4)$$

dónde  $Q$  es la carga intercambiada,  $n$  es el número de electrones,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área electródica,  $\Gamma^*$  es la concentración superficial. Como condiciones en saturación son empleadas en este caso (electrodeposición usando  $-0.2$  V durante 60 s y usando  $250 \mu\text{M}$  de plata), la mayor cantidad de plata adsorbida que puede producir el efecto catalítico puede ser estimada. El valor obtenido en estas condiciones fue de  $1.3 \times 10^{-17}$  moles de plata por QD, considerando que, de manera ideal, los QDs son independientes. Tras la deposición de esta cantidad de plata, el comportamiento de la plata depositada sobre los QDs será similar a la plata depositada sobre la superficie de carbono.

## 7.5 NANOESTRUCTURAS LOCALIZADAS POR ELECTRODEPOSICIÓN SELECTIVA DE PLATA SOBRE QUANTUM DOTS

Como se mencionó previamente, la electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots puede llevarse a cabo controlando las condiciones de la electrodeposición. Por tanto, la utilización de una superficie conductora parcialmente modificada con quantum dots permitiría la generación de nanoestructuras solamente en las zonas donde los QDs fueron previamente añadidos. Con el objetivo de evaluar estructuralmente la electrodeposición selectiva, los electrodos fueron modificados usando diferentes patrones con una disolución de QDs añadida mediante una micropipeta de bajo volumen ( $0.1 - 1 \mu\text{L}$ ) y los QDs se dejaron adsorber hasta secado. Las condiciones de electrodeposición fueron ajustadas para estar por debajo de la saturación (se utilizó un potencial de deposición de  $-0.1 \text{ V}$  con tiempos de deposición entre  $15-60 \text{ s}$  y  $50-250 \mu\text{M}$  de la disolución de plata) ya que al modificar los electrodos con un menor volumen de QDs, la saturación de QDs ocurre tras la deposición de una menor cantidad de plata. Con el objetivo de monitorizar la saturación, se llevaron a cabo voltamperogramas de barrido lineal para controlar si el proceso de redisolución al potencial de  $+0.05 \text{ V}$  aparecía. Para casos específicos donde las condiciones fueron muy suaves ( $-0.1 \text{ V}$ ,  $15 \text{ s}$  y  $50 \mu\text{M}$  o menos), la redisolución de plata fue indicada por el proceso voltamperométrico característico pero no se observaron nanopartículas de plata en las imágenes de SEM. Este hecho indica que las nanopartículas generadas de esta forma fueron muy pequeñas ( $< 30 \text{ nm}$ ), siendo muy complicado encontrar estas partículas en una superficie tan rugosa y opaca como el carbono serigrafiado. La [Figura 7.13](#) muestra imágenes de SEM (a diferentes magnificaciones) de un SPCE modificado con varias gotas de  $0.5 \mu\text{L}$  de una disolución de  $50 \text{ nM}$  de QDs tras la electrodeposición de  $50 \mu\text{M}$  de plata durante  $60 \text{ s}$  usando  $-0.1 \text{ V}$  como potencial de deposición. Se puede observar una clara diferencia entre la superficie modificada con QDs y la parte electródica sin modificar. La plata es claramente depositada sobre los QDs, generando una superficie nanoestructurada solamente en el área modificada, mientras que en la superficie sin modificar no se observó plata. Como control, los electrodos fueron modificados solamente con la disolución reguladora y la electrodeposición de plata se llevó a cabo. Aunque en algunos casos, plata fue observada en la superficie electródica, no existía preferencia por las zonas modificadas y partículas dispersas fueron observadas en toda la superficie. Curiosamente, como la [Figura 7.13B](#) revela, el patrón de plata se observa a una baja magnificación ya que la alta cantidad de quantum dots, y, por tanto, de nanopartículas de plata genera una nanoes-

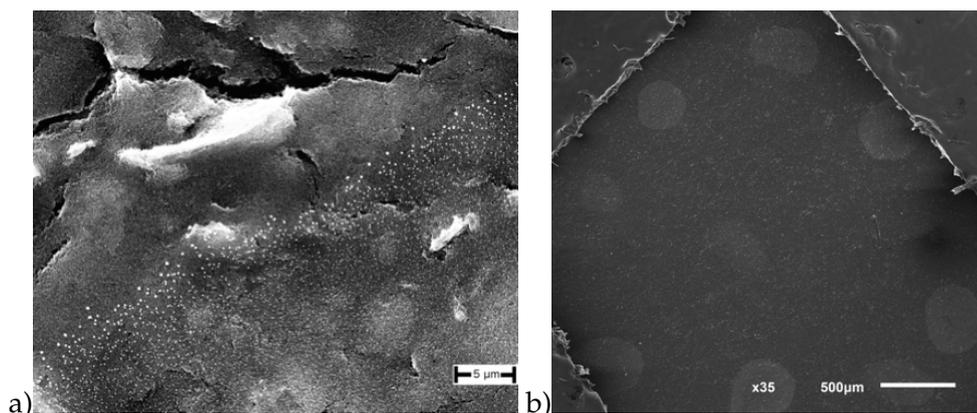


Figura 7.13: a) Imagen SEM de un SPCE parcialmente modificado con diferentes gotas de una disolución de QDs y tras la electrodeposición con plata. En esta figura se muestra el borde de una gota para visualizar la interfase entre la superficie de carbono modificada con QDs y sin modificar. b) Imagen SEM del mismo electrodo a una magnificación más baja.

estructura quasi-contínua visible. Como se observó en la [Figura 7.11](#), con una concentración más baja de QDs, las nanopartículas localizadas se presentan de forma más dispersa en lugar de una nanoestructura quasi-contínua como ocurre en este caso (usando 50 nM de QDs). El método desarrollado en este trabajo muestra la fácil generación de superficies nanoestructuradas localizadas por electrodeposición. Este proceso puede ser llevado a cabo en un corto período de tiempo en cualquier superficie conductora. Si la modificación de los electrodos con la disolución de QDs se lleva a cabo usando instrumentación automática más sofisticada, una mayor resolución y diferentes tipos de patrones estructurales podrían ser generados en las superficies específicas.

## 7.6 DETECCIÓN DE QUANTUM DOTS USANDO LA ELECTRODEPOSICIÓN SELECTIVA DE PLATA

La electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots depende de la cantidad de quantum dots en la superficie electródica. Este hecho puede ser usado con propósitos analíticos en (bio)sensores electroquímicos donde los quantum dots son empleados como marcas. Como prueba de concepto, se llevó a cabo la determinación de quantum dots usando la electrodeposición de plata sobre estas nanopartículas y la corriente de pico del proceso de redisolución al potencial más positivo (+0.45 V) fue empleada como señal analítica. El procedimiento de detección fue, brevemente, como sigue: quantum dots fueron

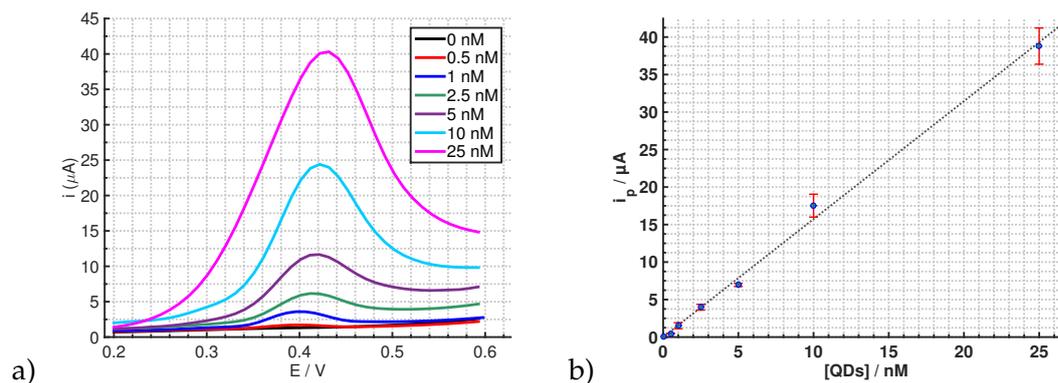


Figura 7.14: a) Respuesta voltamperométrica de redisolución de para SPCEs modificados con diferentes concentraciones de QDs (0, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 25 nM). b) Recta de calibrado representando la corriente de pico frente a la concentración de QDs para las mismas concentraciones.

depositados en la superficie electródica hasta su adsorción (30 min), y una disolución de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ag(I)}$  en  $\text{NH}_3$  1 M fue añadida sobre el electrodo. El potencial de deposición y tiempo de deposición fueron optimizados para obtener la mayor señal analítica. No se observó ninguna señal a este potencial (+0.45 V) para el electrodo sin QDs, incluso usando los potenciales y tiempos de deposición más elevados, lo que destaca la alta selectividad de este proceso. La deposición se llevó a cabo aplicando un potencial de -0.2 V durante 60 s, y la señal analítica se obtuvo usando voltamperometría de pulso diferencial. Como se observa en la [Figura 7.14A](#), la respuesta voltamperométrica fue proporcional a la concentración en partículas de los QDs de la disolución inicial. La corriente de pico obtenida fue lineal con la concentración de QDs en un rango desde 0.5 a 25 nM, siguiendo la ecuación:  $i_p (\mu\text{A}) = 1.57 [\text{QDs}] (\text{nM}) + 0.007$ ,  $R^2 = 0.996$ . La recta de calibrado se muestra en la [Figura 7.14B](#). Las características analíticas obtenidas (ver [Tabla 7.2](#)) para la determinación de quantum dots usando este método muestran un límite de detección de 130 pM, que considerando los 10  $\mu\text{L}$  de muestra utilizados equivale a solamente 1.3 fmol de QDs. En el trabajo descrito en el [Capítulo 4](#), se desarrolló una metodología para determinar QDs mediante un ataque ácido y la detección del Cd liberado a la disolución. Sin embargo, la electrodeposición selectiva de plata mejora el límite de detección en un orden de magnitud, disminuyéndolo hasta concentraciones de pM. Además, como no es necesario un ataque ácido para liberar el metal electroactivo, el procedimiento es simplificado y se reduce el tiempo de análisis.

| Referencia     | Rango lineal          | Sensibilidad                   | Límite de detección |
|----------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------|
| <sup>248</sup> | 8 - 230 $\mu\text{M}$ | 0.05 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ | 8 $\mu\text{M}$     |
| QDs-HCl        | 5 - 200 nM            | 0.23 $\mu\text{A}/\text{nM}$   | 2.6 nM              |
| Ag-QDs         | 0.5 - 25 nM           | 1.57 $\mu\text{A}/\text{nM}$   | 130 pM              |

Tabla 7.2: Características analíticas de varias metodologías de detección electroquímica de QDs usando electrodos serigrafados.

Este método tiene, también, ventajas en comparación al reducción de plata sobre nanopartículas de oro, previamente descrito<sup>272,273</sup>. En ese caso, la concentración de plata y el potencial y tiempo de deposición son parámetros extremadamente críticos que deben ser fijados de forma muy precisa para producir la deposición selectiva reproducible de la plata sobre las nanopartículas de oro. Con el método desarrollado en este trabajo, la señal analítica es un proceso de redisolución selectivo de la plata depositada solamente sobre los QDs. Este proceso es relativamente independiente de la deposición de plata sobre el resto de la superficie electródica, y por tanto, en este caso, no es necesario ajustar críticamente los parámetros de la deposición. Con el objetivo de obtener la mayor sensibilidad posible, se deben utilizar condiciones saturantes (los QDs deberían estar saturados con plata), ya que la selectividad vendrá dada, como se ha mencionado, por el proceso de redisolución selectivo. Este hecho significa que, aunque parte de la plata no estuviera depositada selectivamente, la corriente de pico del proceso de redisolución al potencial más positivo continúa siendo proporcional a la cantidad de QDs en la superficie electródica.

## 7.7 CONCLUSIONES

En este trabajo, se describe la deposición electrocatalítica selectiva de plata sobre la superficie de quantum dots. El comportamiento electroquímico de la plata depositada sobre los quantum dots es muy diferente a la plata depositada en carbono o en nanopartículas de oro, como se ha descrito anteriormente en la literatura. Los resultados electroquímicos mostraron dos aspectos principales: por un lado, la plata se adsorbe fuertemente en la superficie de los quantum dots, produciendo un proceso de redisolución selectivo a un potencial mucho más positivo que el proceso de redisolución de plata sobre carbono. Por otro lado, la capacidad para controlar la deposición de manera selectiva permite la generación de superficies con plata solamente en zonas dónde se hubiera modificado previamente con quantum dots. Este hecho puede ser aprovechado para la fabricación localizada de su-

perfiles nanoestructuradas metálicas, que podrían tener una aplicación en la producción de superficies funcionales o como transductores de sensores. Como prueba de concepto, se describe un método para la detección de quantum dots utilizando la electrodeposición selectiva de plata, que da lugar a una mejora significativa de la sensibilidad usando técnicas electroquímicas. Por tanto, la electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots es, también, un método prometedor para la detección en biosensores electroquímicos con quantum dots como marcas.

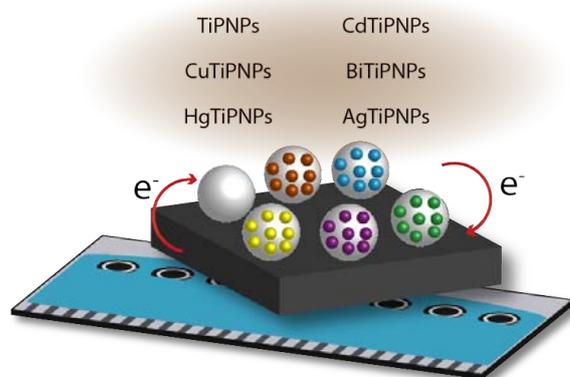


APLICACIONES  
ELECTROANALÍTICAS DE  
NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO  
DE TITANIO



# CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO

---



## 8.1 INTRODUCCIÓN

En la introducción se describieron las principales propiedades de las nanopartículas de fosfato de titanio y se describieron ejemplos en los que la diferente síntesis generaban nanopartículas con diferentes geometrías. En este trabajo se utilizaron TiPNPs de tipo *core-shell* similares a las descritas por Liu et al.<sup>188</sup>, que presentan un núcleo cristalino y un recubrimiento amorfo de fosfato ácido. Estas nanopartículas son muy interesantes por la estabilidad que el núcleo cristalino les puede conferir, mientras que mantienen una superficie muy porosa con gran capacidad de intercambio iónico y capacidad de enlace por grupos fosfato. Sin embargo, este tipo de nanopartículas no han sido muy utilizadas y pocos artículos científicos han sido publicados<sup>188,190,189,191,280</sup>. Las aplicaciones descritas han sido solamente en catálisis y como marca de biosensores electroquímicos. Aunque su uso como marca de biosensores es muy ventajoso por la cantidad de metales que puede

inmovilizar en su estructura, solamente tres metales electroactivos han sido evaluados: Zn, Cd y Pb. Por tanto, otros metales que pueden ser reducidos a un potencial más suave, podrían mejorar la selectividad y la sensibilidad de las medidas, incluso permitiendo la utilización en un medio más extremo capaz de extraer mayor cantidad de iones metálicos.

El objetivo principal de este capítulo fue la caracterización electroquímica de diferentes TiPNPs modificadas con metales electroactivos. Por tanto, se llevó a cabo la síntesis de TiPNPs modificadas con Cd, Bi, Hg, Cu y Ag, y su caracterización microscópica y estructural<sup>1</sup>. Se evaluó el comportamiento voltamperométrico de todas las MTiPNPs en diferentes medios electrolíticos y se llevó a cabo la cuantificación de los iones metálicos introducidos en la estructura. La estabilidad de las TiPNPs modificadas con metales fue estudiada tras almacenarse el producto sólido a temperatura ambiente o una dispersión acuosa a 4 °C durante diferentes tiempos. Además, se evaluó mediante técnicas electroquímicas la diferente capacidad del intercambio iónico en función del contra-anión utilizado en el proceso de síntesis. A continuación, se optimizó la determinación de CdTiPNPs utilizando electrodos serigrafiados con el objetivo de utilizarlas como marca de un biosensor de afinidad que se describe en el [Capítulo 9](#). La posibilidad de tener TiPNPs modificadas con diferentes metales permite su utilización en ensayos multianalito, por lo que se evaluaron las MTiPNPs sintetizadas para su utilización en un biosensor multianalito, teniendo en cuenta, especialmente, la selectividad y sensibilidad de la determinación metálica. Por último, se llevó a cabo la caracterización electroquímica (por voltamperometría y EIS) de electrodos serigrafiados modificados con TiPNPs modificadas con Cu (CuTiPNPs) para conocer en mayor medida su efecto en la superficie electródica ya que fueron utilizados en una aplicación electrocatalítica descrita en el [Capítulo 10](#). Durante todo el trabajo con las TiPNPs se utilizaron tarjetas serigrafiadas de 8 canales.

## 8.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON METALES

Las TiPNPs pueden ser detectadas electroquímicamente tras la introducción de un metal electroactivo en su estructura. TiPNPs modificadas con Zn, Cd y Pb han sido previamente descritas y utilizadas como marca en biosensores electroquímicos. Sin embargo, estos metales se reducen a un potencial ciertamente negativo (entre -1.3 y -0.6 V, normalmente),

---

<sup>1</sup> Aunque, como se comentó, la mayor parte de la caracterización estructural y de la síntesis de las TiPNPs se describe en otra Tesis Doctoral, ya que ha sido un trabajo colaborativo

cuya aplicación puede reducir otras especies concomitantes en la disolución de medida. Además, como ya se ha comentado anteriormente, la HER se produce a un potencial cercano y podría afectar a la eficiencia de la preconcentración metálica sobre la superficie electródica. Por tanto, la evaluación y caracterización electroquímica de otros metales electroactivos introducidos en estas nanopartículas puede conducir a mejores marcas de detección en biosensores electroquímicos. En este trabajo se lleva a cabo la introducción de los siguientes metales electroactivos en la estructura de las TiPNPs: Cd, Bi, Cu, Ag y Hg. Todos estos metales son fácilmente medibles con técnicas voltamperométricas y cuyos procesos de reoxidación suelen aparecer a diferentes potenciales (cubriendo un rango aproximado desde -1 V hasta +0.2 V). Todas las MTiPNPs fueron generadas en las mismas condiciones según el proceso descrito en el [Capítulo 2](#), mediante una reacción de intercambio iónico, y fueron caracterizadas mediante diferentes estudios estructurales y electroquímicos.

### 8.2.1 *Caracterización morfológica de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales*

En la [Figura 8.1](#) se muestran dos imágenes obtenidas mediante TEM de TiPNPs y de CuTiPNPs. Como se puede observar, estas nanopartículas presentan una morfología cuasi-esférica con un diámetro cercano a 30 nm y con una dispersión de tamaños bastante homogénea, específicamente  $29.6 \pm 4.7$  nm para las TiPNPs y  $30.9 \pm 5.1$  nm para las CuTiPNPs. Para el resto de las nanopartículas con metales el tamaño obtenido fue similar. Además, se puede observar a simple vista la estructura porosa de la superficie de estas nanopartículas que se asigna a la presencia de una estructura amorfa de fosfatos ácidos según se describió en la literatura<sup>188</sup>. Aunque mediante las imágenes de TEM no se puede observar un núcleo diferente al recubrimiento (típico de partículas core-shell), la presencia de  $\text{NaTi}(\text{PO}_4)_3$  se confirma mediante XRD y acorde a los resultados descritos por otros autores. Cabe destacar que la introducción en la nanoestructura de los metales no afecta al tamaño ni a la distribución de tamaños de las nanopartículas, indicando que la estructura morfológica general no varía tras llevar a cabo este intercambio iónico. Otro aspecto interesante a resaltar es la diferencia en el tamaño de las NPs generadas en comparación a las TiPNPs obtenidas usando la misma metodología descritas en la literatura (previamente citadas), que presentan un tamaño cercano a 50 nm. Durante todo el trabajo, se ha tenido especial cuidado durante la síntesis (reactivos en buen estado, utilización de caja seca, atmósfera

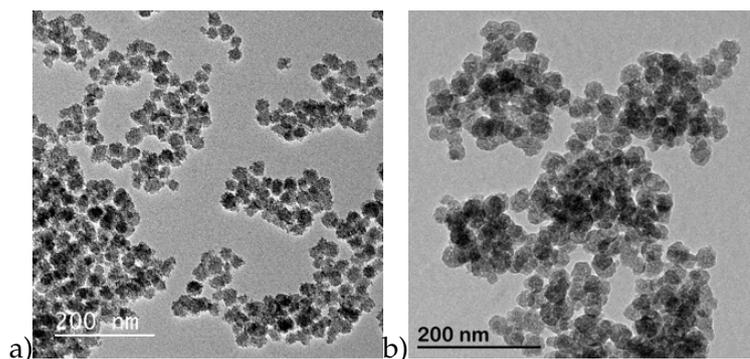


Figura 8.1: Imágenes de TEM de TiPNPs (a) y de CuTiPNPs (b).

inerte de  $N_2$  durante la reacción, etc.) y las nanopartículas sintetizadas siempre tuvieron un tamaño similar, cercano a 30 nm, por lo que la obtención de estas nanopartículas fue relativamente constante a lo largo del tiempo. La diferencia con las NPs descritas en la literatura pone de manifiesto alguna diferencia durante la síntesis, pero debido al procedimiento descrito de forma tan escueta en estos artículos resulta difícil conocer cual es la razón de esta diferencia. Parece que la concentración del agente director de la estructura (surfactante) tiene una importante influencia en la morfología del fosfato de titanio obtenido<sup>190</sup>, pero en ningún caso se obtienen nanopartículas más pequeñas de 50 nm, incluso variando el tipo de surfactante entre AOT o SDS.

### 8.2.2 Estudio voltamperométrico de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales

Las MTiPNPs sintetizadas fueron evaluadas electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica. Se eligió un medio electrolítico que pudiera ser válido para los diferentes metales electroactivos introducidos: una disolución reguladora de acetato 0.1 M pH 4.5. Antes de realizar la medida electroquímica, la superficie del electrodo de trabajo se modifica con una suspensión acuosa de las nanopartículas, generalmente, 2  $\mu$ L con una concentración de 2  $mg mL^{-1}$  hasta secado completo. En la [Figura 8.2](#) se pueden observar los voltamperogramas cíclicos obtenidos para todas las MTiPNPs en acetato. Para las TiPNPs sin modificar con metales solamente se observa un proceso electroactivo en el rango de potenciales estudiados (-1 a +1 V) que comienza a un potencial cercano a -0.8 V y se puede atribuir a la HER, debido a la presencia de protones en el medio. Para las CdTiPNPs, un proceso catódico y un proceso anódico son observados en estas condiciones. El proceso

anódico puede atribuirse a la redisolución del  $\text{Cd}^0$  a  $\text{Cd}^{2+}$  previamente reducido sobre la superficie electródica, mientras que el proceso catódico es debido a la superposición de la reducción de  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Cd}^0$  y la ORR<sup>2</sup> que comienza a un potencial cercano a  $-0.7$  V y se une con el proceso de reducción del Cd a potenciales menores que  $-1$  V, hecho que se confirma al observar la respuesta voltamperométrica en ausencia de CdTiPNPs. En el caso de las BiTiPNPs, no se observan procesos diferentes al blanco haciendo la CV desde potenciales positivos a negativos (para producir la reducción inicialmente y después la reoxidación), y solamente se observa un proceso de oxidación si se realiza una preconcentración inicial a un potencial negativo ( $-1.4$  V durante 30 s, en este caso), y se hace el barrido hacia potenciales positivos. Este hecho parece indicar una mayor dificultad de extraer los iones de bismuto de las nanopartículas (o una menor cantidad de Bi introducida en la síntesis). Dos efectos pueden estar influenciando esta respuesta como son la menor solubilidad de los iones de  $\text{Bi}^{3+}$  (normalmente formando alguna especie óxido-hidróxido incluso a pH relativamente bajo), y el mayor estado de oxidación del Bi(III) en comparación a los otros metales que dificulte su introducción en la estructura (o que sature mayor cantidad de grupos fosfato, y que menor cantidad sea introducida). En la voltamperometría de las CuTiPNPs, aparecen dos procesos catódicos, difíciles de atribuir, pero que deben ser la ORR y la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$ , ya que podrían aparecer a un potencial similar. El proceso de oxidación sobre  $-0.2$  V con una alta corriente de pico, apunta a una gran cantidad de Cu dentro de estas nanopartículas o a una mayor facilidad para su extracción y preconcentración en estas condiciones. Para las AgTiPNPs, parece observarse un proceso de reducción justo antes de la ORR, generando  $\text{Ag}^0$  que cataliza la ORR y por esa razón aparece a un potencial tan positivo (antes de  $-0.5$  V) en comparación a otros metales, en el barrido inverso se observa el proceso característico de la oxidación de  $\text{Ag}^0$  a  $\text{Ag}^+$ . Mientras que para las HgTiPNPs, aunque presentan una menor influencia de la ORR en la CV, no se observan procesos catódicos muy agudos, aunque la presencia del proceso de oxidación evidencia que se ha producido la reducción del  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$ , probablemente a un potencial menor de  $-0.5$  V.

Estos estudios ponen de manifiesto que los diferentes metales introducidos en las MTiPNPs pueden ser reducidos mediante la aplicación de un potencial adecuado capaz de extraer el ion metálico de la estructura de las TiPNPs y llevar a cabo su preconcentración electródica, que viene indicado por un proceso característico de redisolución muy eficiente y capaz de ser estudiado con mayor claridad que los procesos de reducción. Por este motivo, se

---

<sup>2</sup> La ORR aparece a estos potenciales ya que el metal reducido es capaz de catalizar esta reacción.

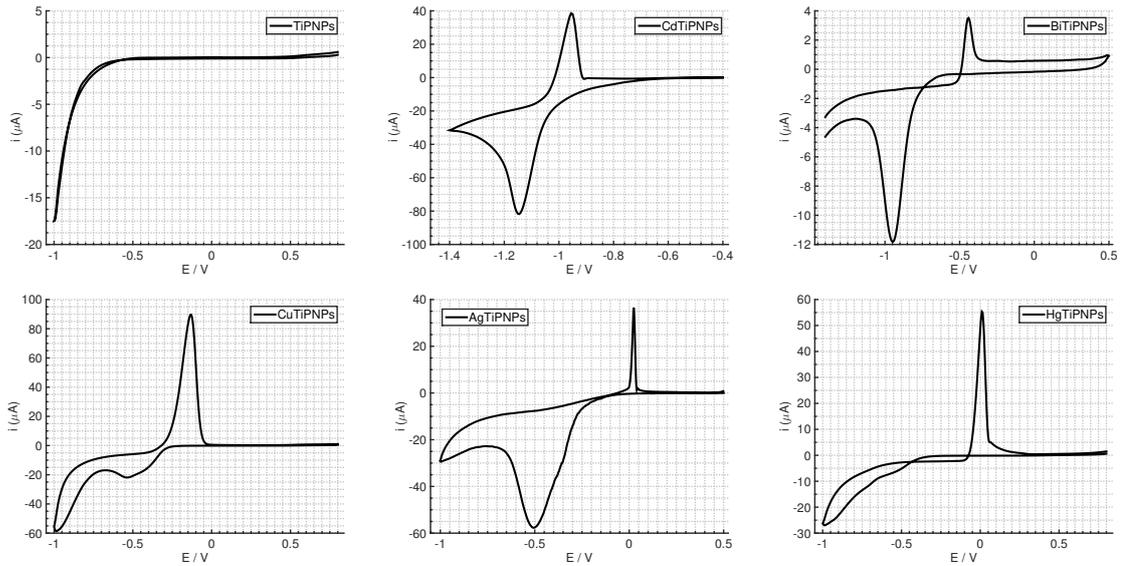


Figura 8.2: Voltamperometrías cíclicas de las diferentes MTiPNPs sintetizadas.

utilizaron las magnitudes ( $i_p$  y  $E_p$ ) de este proceso de redisolución para la comparación electroquímica de estas nanopartículas en los experimentos discutidos posteriormente.

### 8.2.3 Comportamiento en diferente medio electrolítico

El medio electrolítico utilizado para la medida metálica puede tener un efecto muy significativo, tanto en la sensibilidad de la detección como en la selectividad para resolver los diferentes procesos electroquímicos de las MTiPNPs que aparecen a diferentes potenciales. Por esta razón, se modificaron las tarjetas serigrafiadas con diferentes MTiPNPs y sobre las nanopartículas se añadió el electrolito de fondo determinado para hacer la medida. Existen dos ventajas de utilizar esta forma de medida (adsorción de las NPs en la superficie electródica), por un lado, se imita en cierto modo la configuración que se utilizaría en un sistema biosensor o en un electrodo nanoestructurado, con las nanopartículas en íntimo contacto con la superficie, y por otro lado, es posible la evaluación del comportamiento de estas nanopartículas con electrolitos en los que podrían no ser estables. Diferentes medios electrolíticos a concentración constante de 0.1 M fueron utilizados: reguladora de acetato pH 4.5, reguladora PBS pH 7.0, reguladora Tris pH 7.4,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  y  $\text{NaOH}$ .

Las medidas se llevaron a cabo mediante voltamperometría cíclica desde +1 hasta -1.2 V (y su barrido inverso) y sin una etapa de preconcentración anterior. Con el objetivo

de comparar las diferentes respuestas, se obtuvieron las magnitudes para la corriente y potencial del proceso anódico (de redisolución). Aunque se espera una diferente reducción según el potencial de reducción de cada metal, todas las medidas se hicieron en las mismas condiciones, aunque con un potencial lo suficientemente negativo para producir la reducción de los diferentes metales. La única excepción fue para las CdTiPNPs ya que por su reducción a un potencial especialmente negativo se hizo el barrido de potenciales desde +1 hasta -1.4 V. En todos los casos se obtuvo un solo proceso de redisolución menos para las CuTiPNPs en un medio de cloruros, para la cual se obtuvieron dos procesos, típicos de la oxidación de Cu(0) a Cu(I) y de Cu(I) a Cu(II).

En la [Figura 8.3](#) se muestran las corrientes de pico obtenidas para el proceso de redisolución metálica para cada MTiPNPs en los diferentes medios electrolíticos. Se encuentran diferencias significativas en las corrientes de pico, ya sea para la misma nanopartícula en diferentes medios o para partículas diferentes en el mismo medio. Incluso en algunos casos, no se observa un proceso de redisolución del metal correspondiente. Hay que considerar que la corriente de pico voltamperométrica viene afectada por el número de electrones intercambiados, es decir, una transferencia de mayor número de electrones producirá una mayor corriente de pico, sin embargo si se normaliza por esta magnitud según la [8.1](#) para un proceso controlado por adsorción (como es el caso de la redisolución anódica), se encuentran resultados similares, mostrando una mayor capacidad de preconcentración en un orden general de CuTiPNPs > AgTiPNPs > HgTiPNPs > BiTiPNPs > CdTiPNPs. Aunque el potencial aplicado puede afectar a una diferente preconcentración como se indicó, los resultados encontrados difieren de los potenciales de pico a los que estas especies se reducen, que en general, son del orden de HgTiPNPs > AgTiPNPs > CuTiPNPs > BiTiPNPs > CdTiPNPs. Por tanto, incluso este experimento muestra una alta capacidad de preconcentración para las CuTiPNPs en comparación al resto de las nanopartículas. Como norma general, se observa que un medio ácido ofrece los mejores resultados en términos de preconcentración electroquímica de los metales. Incluso se observa una señal significativa para BiTiPNPs en HNO<sub>3</sub> y HCl, que demuestra claramente como estos medios son capaces de extraer con mayor facilidad los metales de la nanopartícula. Esto se confirma mediante el análisis del espectro IR de las CdTiPNPs antes de ponerse en contacto con un medio ácido y tras ponerse en contacto durante 60 s con una disolución de HCl 0.1 M. Como se puede observar en la [Figura 8.4](#), las bandas asignadas a los grupos (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>-</sup> se recuperan pareciéndose a la especie inicial sin metal (esto también se comprueba por análisis de EDX donde la relación M/Ti se hace prácticamente cero). Este hecho demuestra

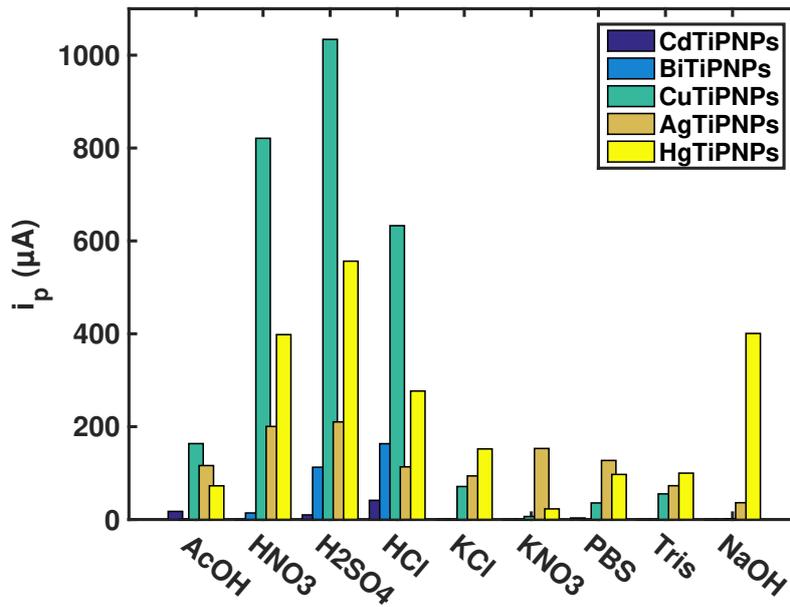


Figura 8.3: Efecto del medio electrolítico en la corriente de pico de redisolución para todas las MTiPNPs.

la extracción completa del metal en un medio ácido, que resulta en un medio electrolítico muy interesante para la detección electroquímica de estas nanopartículas. La utilización de este medio puede ser muy oportuno en biosensores ya que, además, podría destruir las proteínas que recubren la superficie electroda liberando parte del área electroactiva para la preconcentración metálica en comparación a otros medios con pH más neutro como acetato o Tris/PBS.

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma^*}{4RT} v \quad (8.1)$$

Por otro lado, en la [Figura 8.5](#) se representan los potenciales de pico anódico ( $E_{pa}$ ) obtenidos para la redisolución metálica de cada una de las MTiPNPs en los diferentes medios electrolíticos. Como se observa el medio tiene un efecto significativo en el valor de este potencial y es algo que se debe considerar al evaluar las posibilidades de detección multianalito utilizando estas nanopartículas.

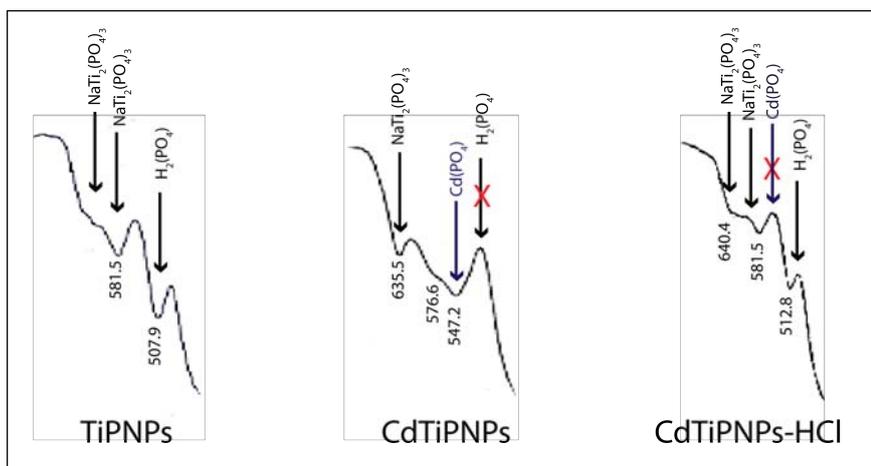


Figura 8.4: Espectro IR para TiPNPs, CdTiPNPs y CdTiPNPs tras el contacto con una disolución de HCl 0.1 M durante 60 s.

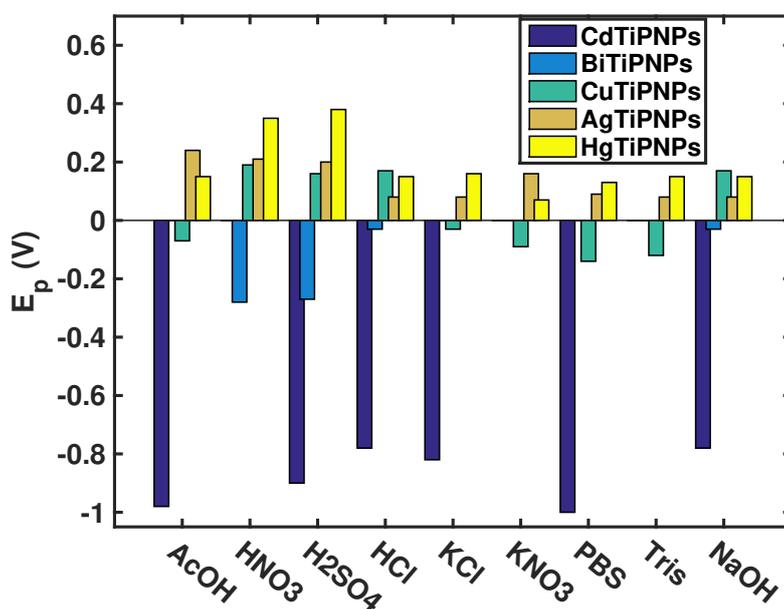


Figura 8.5: Efecto del medio electrolítico en el potencial de pico de redisolución para todas las MTiPNPs.

#### 8.2.4 Determinación de la cantidad metálica en nanopartículas de fosfato de titanio

La determinación de la cantidad del metal que se encuentra dentro de la estructura de las MTiPNPs puede llevarse a cabo mediante técnicas voltamperométricas sencillas. Como se ha visto, la adición de un medio ácido a las MTiPNPs es capaz de extraer los metales a la disolución de manera prácticamente cuantitativa, por lo que la disolución resultante puede medirse para conocer la concentración de metal, y relacionarse con la cantidad de MTiPNPs presentes inicialmente. En este caso se utilizó voltamperometría de onda cuadrada para hacer una medida directa de una disolución que consistía en 2  $\mu\text{L}$  de una suspensión de 2  $\text{mg mL}^{-1}$  de MTiPNPs y 98  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, la cual se lleva a un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para asegurar la extracción cuantitativa (e incluso podría producirse la destrucción de las NPs)<sup>3</sup>. Para el caso de las CdTiPNPs, con el objetivo de evitar un medio ácido final, se hizo una disolución con 2  $\mu\text{L}$  de MTiPNPs, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M, y tras aplicar ultrasonidos, se añadieron 93  $\mu\text{L}$  de reguladora acetato 0.1 M pH 4.5 (con 1 ppm de Bi(III)). La señal analítica de cada tipo de nanopartículas fue obtenida y evaluada en un calibrado específico para cada metal hecho en las mismas condiciones experimentales (y añadiendo TiPNPs a la disolución como control). De esta manera se pudo estimar la cantidad de metal (ya sea en peso o moles) por cantidad de MTiPNPs (en peso). Los resultados obtenidos se muestran en la [Tabla 8.1](#). En primer lugar, destaca la poca cantidad que se introduce en las AgTiPNPs, sin embargo, este dato parece ser consecuencia de que parte de la plata que se introduce es reducida espontáneamente, hecho que se describe en un capítulo posterior, se encuentra como AgNPs y no es tan fácilmente medida como el ion libre en comparación con los otros metales<sup>4</sup>. Por otro lado, estos resultados proporcionan información cuantitativa de la razón por la que las Cu-TiPNPs generan unas corrientes de pico tan elevadas, como es su elevada carga metálica en comparación al resto de nanopartículas. Entre las demás no existe una gran diferencia (en concentración molar), y sus diferentes señales parecen un efecto de la diferente actividad electroquímica o su capacidad de extracción de la estructura de las MTiPNPs. En este sentido, aunque las BiTiPNPs no presentaron buenos resultados en la medida directa, parece que la cantidad metálica introducida es muy parecida al Hg o Cd. Por tanto, la dificultad para medir las BiTiPNPs es debido a una difícil extracción, algo que puede

<sup>3</sup> De hecho, si una disolución más concentrada, en la que el material se observa visualmente, se sonica en un medio ácido acaba volviéndose transparente con el tiempo, hecho que demuestra la digestión de las nanopartículas bajo ultrasonidos y medio ácido

<sup>4</sup> Y, por tanto, los resultados obtenidos de la determinación metálica para las AgTiPNPs no son fiables.

|                | AgTiPNPs | CdTiPNPs | CuTiPNPs | BiTiPNPs | HgTiPNPs |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| mg M / g NPs   | 5.9      | 50.3     | 107.7    | 96.8     | 98.5     |
| mmol M / g NPs | 0.05     | 0.45     | 1.69     | 0.46     | 0.49     |

Tabla 8.1: Cantidad estimada de metal introducido en las MTiPNPs.

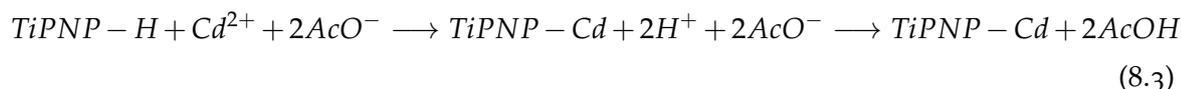
explicarse por la menor estabilidad del Bi(III) en disolución en comparación a los otros metales, y por tanto, la estabilización que le proporcionan los grupos fosfato dificultan su reducción directa. Otros autores han descrito cargas metálicas para las CdTiPNPs de 58.6 o 70.4 mg por g de nanopartícula, por lo que, estos resultados coinciden en buen grado.

### 8.2.5 Evaluación electroquímica del contra-anión del intercambio

En el trabajo colaborativo de la síntesis de estas nanopartículas se ha descubierto que el anión de la sal metálica durante el intercambio iónico juega un papel muy importante en la cantidad de metal que se introduce en la nanopartícula. Esto es así ya que según los estudios realizados, este proceso sigue el mecanismo general de la ecuación 8.2. Este mecanismo sugiere que a mayor extracción de protones de las nanopartículas, se introduce una mayor cantidad de metal en la estructura. Por tanto, en caso de utilizar un contra-anión de la sal metálica que sea una base más débil debería ser capaz de unir mayor cantidad de protones, y desplazará esta reacción hacia la derecha según el principio de Le Chatelier.



Aunque se ha comprobado esta mayor introducción mediante técnicas estructurales como EDX, IR o RMN, resultando en una mayor relación M/Ti o una menor presencia de grupos  $(H_2PO_4)^-$ , se llevó a cabo un estudio del efecto del contra-anión en las medidas electroquímicas, usando CdTiPNPs sintetizadas con una sal de nitrato y una sal de acetato. Como el ácido acético es un ácido más débil que el ácido nítrico, se encontrará en forma iónica en menor cantidad, provocando un desplazamiento de la reacción hacia la derecha en mayor medida que con la sal de nitrato, según las ecuaciones siguientes:



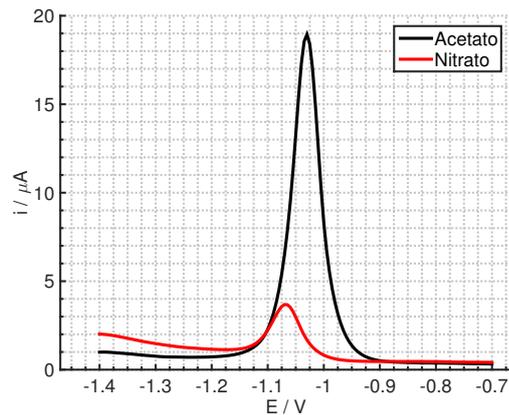


Figura 8.6: Voltamperogramas de onda cuadrada para CdTiPNPs sintetizados usando una sal de nitrato (rojo) y una sal de acetato (negro).



Para la evaluación electroquímica se llevó a cabo la misma metodología que en el caso anterior para obtener la cantidad de metal en las nanopartículas, obteniéndose los voltamperogramas de onda cuadrada de la Figura 8.6. Como se puede observar una mayor señal de cadmio es obtenida para las CdTiPNPs sintetizadas con la sal de acetato, como se esperaba teóricamente. Haciendo un experimento como el que se describe en el apartado anterior, se calcula que estas CdTiPNPs tienen 199.5 mg de Cd (1.8 mmoles) por cada g de MTiPNPs, mostrando como este anión tiene un efecto realmente importante en la cantidad de metal intercambiado. Prácticamente se encuentra una mejora del 400 % en la cantidad metálica introducida en comparación a utilizar una sal de nitrato en la síntesis.

Sin embargo, en los estudios que se describen posteriormente con CdTiPNPs, se utilizaron nanopartículas sintetizadas con  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  por dos razones principales: cuando se descubrió esta capacidad, parte del trabajo con CdTiPNPs ya estaba hecho con lo que se decidió seguir usando estas nanopartículas. También, como se describirá posteriormente, las MTiPNPs que ofrecen mejores características de detección fueron las modificadas con Hg y Cu, las cuales se sintetizaron con una sal de acetato. Sin embargo, la síntesis de MTiPNPs utilizando diferentes aniones o incluso evaluando el efecto de especies externas (para extraer protones) en la síntesis puede ser un trabajo futuro muy interesante con el objetivo de obtener nanopartículas que generen señales todavía más amplificadas.

### 8.2.6 Estabilidad y reproducibilidad electroquímica

La reproducibilidad electroquímica se lleva a cabo haciendo la medida voltamperométrica de varias disoluciones preparadas de la misma síntesis y de disoluciones de MTiPNPs preparadas de diferentes síntesis. En general, una RSD alrededor del 8% fue encontrada para todas las MTiPNPs evaluadas en ambos casos. Por lo que se concluye que la reproducibilidad entre síntesis es adecuada. Parece que en las condiciones de síntesis el metal introducido por intercambio iónico se produce de manera cuantitativa en todas las ocasiones, resultando en pocas desviaciones entre diferentes síntesis.

La estabilidad de las MTiPNPs almacenadas tras su fabricación fue evaluada de dos formas diferentes. En primer lugar, se almacenó el producto en estado sólido a temperatura ambiente en un recipiente cerrado herméticamente y su respuesta electroquímica fue medida tras un proceso consistente en la dispersión en disolución seguido de su precipitación, lavado con H<sub>2</sub>O y redispersión en una disolución acuosa. Con este objetivo, se buscaba conocer si el metal de la nanopartícula podía ser extraído de alguna manera espontánea (tras lavarse con H<sub>2</sub>O) mientras estaba almacenado en forma sólida. Como alternativa, las MTiPNPs se dispersaron en una disolución acuosa y se almacenaron a 4 °C. Su respuesta electroquímica fue medida de manera similar al caso anterior tras su precipitación, lavado con H<sub>2</sub>O y redispersión. De esta forma, en el caso que parte del metal se eliminara de la nanopartícula, podría ser separado y no influiría en la señal. La forma de medida en ambos casos fue similar, añadiendo 2 µL de la suspensión (2 mg mL<sup>-1</sup>) sobre la superficie del electrodo serigrafado hasta su secado completo, y se utilizó voltamperometría cíclica para llevar a cabo la deposición y redisolución (sin una etapa de preconcentración) en una reguladora de acetato para todos los casos. A continuación, se describen los resultados obtenidos para CdTiPNPs, aunque para BiTiPNPs, CuTiPNPs y HgTiPNPs se llega a las mismas conclusiones. El caso de las AgTiPNPs también se describe.

Los resultados para la medida durante dos meses del producto sólido almacenado se muestran en la [Figura 8.7](#), y se representan como el porcentaje de señal obtenida en relación con la señal al comienzo del estudio (que se considera el 100%). Como se puede observar, la respuesta electroquímica de las CdTiPNPs se mantiene de manera estable con el tiempo, con una desviación estándar relativa en las medidas de alrededor del 10% (entre el primer día de almacenamiento y el resto de los días), algo aceptable que puede ser debido al proceso de precipitación y dispersión en el que se puede perder una pequeña parte del producto de manera aleatoria (si no precipita completamente). Como se comen-

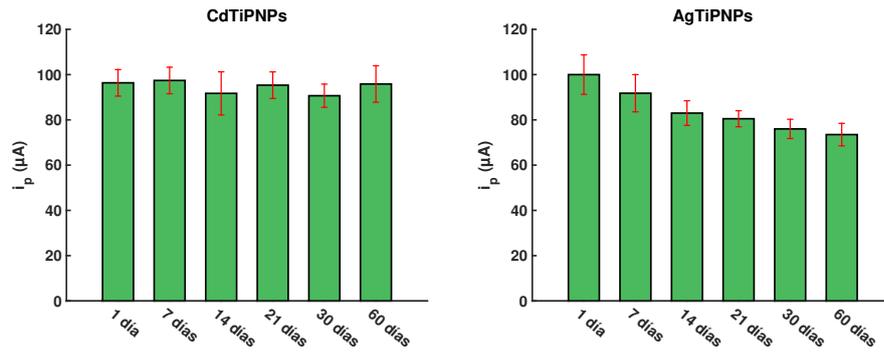


Figura 8.7: Efecto del tiempo de almacenamiento en la respuesta voltamperométrica de CdTiPNPs y AgTiPNPs tras su almacenamiento sólido.

tó anteriormente, en medidas de diferentes disoluciones preparadas sin llevar a cabo la precipitación, se obtiene una menor desviación ( $\sim 8\%$ ), hecho que parece corroborar que la mayor dispersión en este caso, sea debido al procesado de muestra. Un caso excepcional es el de las AgTiPNPs, en las que si se observa una peor respuesta con el tiempo (especialmente en las primeras semanas), hecho que podría explicarse por la reducción espontánea de la plata en estas nanopartículas, algo que se puede corroborar a simple vista ya que el color del producto sólido inicialmente blanco, se vuelve grisáceo, típico de plata reducida. Aunque las AgNPs generadas pueden ser oxidadas, deben estar en contacto íntimo con la superficie (para que haya efecto túnel), y esto ocurrirá en algunos casos, pero en otros no, por lo que en general, con mayor tiempo de almacenamiento, una mayor cantidad de AgNPs son generadas, y por tanto, una menor señal electroquímica obtenida. Por esta razón, cuando se han utilizado AgTiPNPs en este trabajo, se han mantenido siempre aisladas de la luz y utilizadas en dos semanas como máximo desde el momento de la síntesis.

Los resultados obtenidos tras el almacenamiento en una dispersión acuosa de las MTiPNPs se muestran en la [Figura 8.8](#). En este caso, se observa que estas nanopartículas son estables en una disolución acuosa durante unas dos semanas, ya que se obtiene una disminución solamente del 10% de la señal analítica para este tiempo, que puede ser comparable a los estudios previos. Sin embargo, la señal decrece con tiempo mayores. Esta desviación de la señal inicial es relativamente elevada como para achacarse solamente al procesado de muestra (precipitación/redispersión), por lo que parece que algún otro efecto está ocurriendo en la estabilidad de las nanopartículas. Mediante RMN de  $^{31}\text{P}$  se ha comprobado como los grupos fosfatos ácidos (especialmente  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$ ) de las TiPNPs disminuyen con el tiempo, mientras que se observa un aumento significativo del  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Este hecho signi-

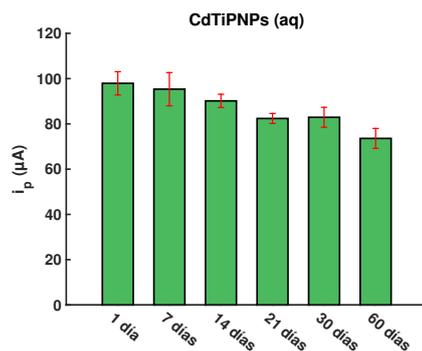


Figura 8.8: Efecto del tiempo de almacenamiento en la respuesta voltamperométrica de CdTiPNPs tras su almacenamiento en disolución.

fica que en presencia de agua, los fosfatos ácidos pueden ser hidrolizados, por lo que su eliminación puede conllevar una disminución de la carga metálica de las nanopartículas. Otra posibilidad podría ser el intercambio iónico del metal con  $\text{H}^+$  del medio, que aunque fuera menos favorable, podría ocurrir en disolución acuosa a largos tiempos. Teniendo en cuenta estos resultados de estabilidad, las disoluciones acuosas de MTiPNPs utilizadas han sido siempre generadas el día de trabajo, con excepción de las MTiPNPs biofuncionalizadas, que se han utilizado siempre lo antes posible y, generalmente, como máximo en una semana desde su funcionalización proteica.

### 8.3 EVALUACIÓN ANALÍTICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON METALES

En este apartado se describe la optimización de una metodología electroquímica para determinar tanto CdTiPNPs como AgTiPNPs en SPCEs. Las CdTiPNPs se utilizan en un trabajo descrito en el [Capítulo 9](#) como marca electroquímica de biosensores, mientras que la determinación de AgTiPNPs se lleva a cabo con el objetivo de su comparación con una técnica electrocatalítica que se describe en el [Capítulo 10](#). Por último, se estudia el comportamiento electroquímico de electrodos serigrafados modificados con una película de CuTiPNPs mediante voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

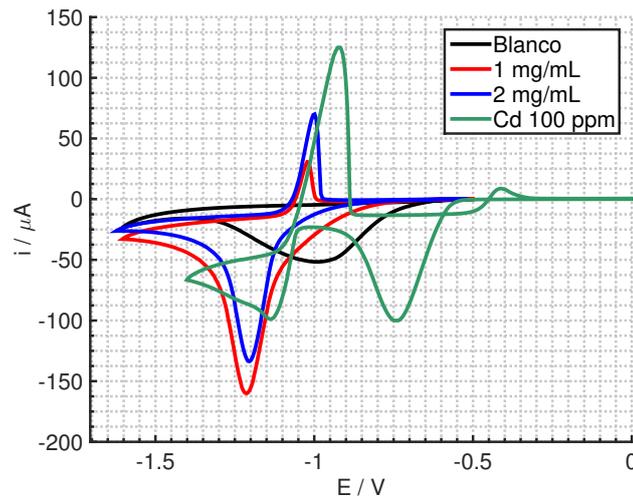


Figura 8.9: Respuesta voltamperométrica de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de CdTiPNPs, de Cd(II) en disolución y del electrolito de fondo utilizado.

### 8.3.1 Método de detección de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio en electrodos serigrafiados

Aunque la detección electroquímica de CdTiPNPs ya había sido descrita en la literatura, se optimizó un método específico aplicado a las tarjetas serigrafiadas de 8 canales, y se evaluaron algunos de los parámetros que podían afectar a la señal analítica, y de los que no se tenían constancia en los estudios publicados. En primer lugar, se llevó a cabo el registro de CVs de CdTiPNPs a diferentes concentraciones para identificar los procesos, además de su comparación con el electrolito de fondo y una disolución de  $\text{Cd}^{2+}$  libre. En este caso, se utilizó una suspensión de nanopartículas directamente sin adsorber sobre el electrodo. En la [Figura 8.9](#) se muestran los resultados obtenidos. Parece como en las mismas condiciones, la reducción del  $\text{Cd}^{2+}$  libre en disolución es algo más favorable que la que se produce desde las nanopartículas. Este hecho demuestra que la reducción del metal se lleva a cabo desde las nanopartículas y que no se encuentra libre cuando las nanopartículas se encuentran en una disolución, ya que en ese caso, el potencial de reducción debería ser similar. Por otro lado, la ORR que se observa significativamente en la disolución del blanco está minimizada cuando existen Cd o CdTiPNPs en disolución. Por otro lado, el proceso de redisolución aparece a un potencial similar en todos los casos, que significa que la redisolución sigue un proceso de oxidación de la misma naturaleza, y que la presencia de TiPNPs no afecta a esta redisolución.

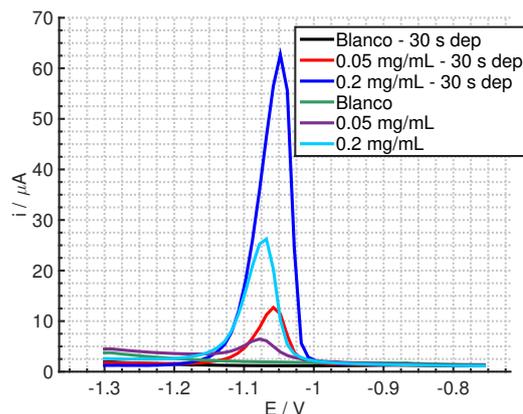


Figura 8.10: Respuesta DPV para diferentes concentraciones de CdTiPNPs tras la electrodeposición durante 30 s y sin la electrodeposición.

A continuación se optimizaron diferentes parámetros como la técnica electroquímica de la etapa de redisolución (LSV, DPV o SWV), la concentración (0.1 o 0.2 M), pH (4.5, 5.0) y tipo de reguladora utilizada (acetato o citrato) y el efecto de una película de bismuto (y su concentración). Aunque en el estudio de las MTiPNPs con diferentes electrolitos de fondo, la mayor señal fue obtenida con HCl, al utilizar un procedimiento con etapa de deposición (para obtener mayor sensibilidad), este medio no permitió obtener señales reproducibles por lo que se realizó esta optimización con un medio de pH mayor (acetato o citrato). En este caso, las CdTiPNPs fueron adsorbidas sobre la superficie electródica. Se obtuvieron los mejores resultados utilizando SWV, reguladora acetato 0.1 M y pH 5.0, y la película de Bi se generó in situ con una concentración en disolución de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por otra parte, se evaluó la posibilidad de detectar estas nanopartículas sin llevar a cabo la etapa de preconcentración o con ella. Algunos de los trabajos publicados en los que hacen uso de CdTiPNPs no aplican la etapa de deposición, y en consecuencia, el tiempo de análisis es menor. Sin embargo, por lo general, se obtiene una mejora de la sensibilidad al preconcentrar sobre la superficie electródica y la posibilidad de detectar menores cantidades. Se registraron diferentes voltamperogramas con un tiempo de deposición de 30 s, aplicando -1.3 V, y se comparó con un barrido directo. En la [Figura 8.10](#) se muestran los resultados, que indican que incluso un corto tiempo de deposición es muy importante para obtener señales más altas capaces de detectar menores concentraciones, ya que la señal para el blanco no se incrementa.

Finalmente, se registraron varios voltamperogramas a diferentes concentraciones de Cd-TiPNPs con el objetivo de realizar un calibrado. Tanto la respuesta voltamperométrica co-

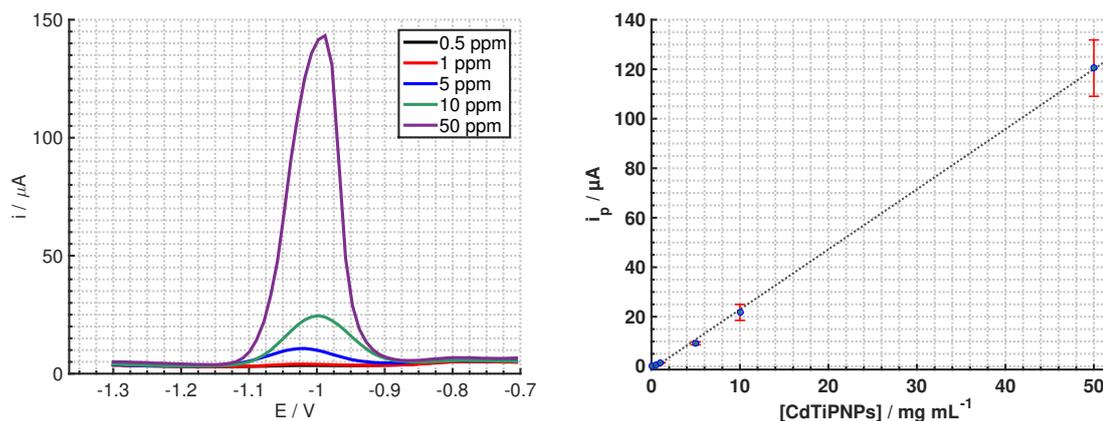


Figura 8.11: Respuesta DPV para concentraciones crecientes de CdTiPNPs y curva de calibrado asociada.

mo la recta de calibrado se muestran en la [Figura 8.11](#). Se obtuvo un rango lineal entre  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  siguiendo la recta de ecuación:  $i_p (\mu\text{A}) = 2.4 [\text{CdTiPNPs}] (\mu\text{g mL}^{-1}) - 1.3$ ,  $R^2 = 0.990$  ( $n=3$ ), con una RSD entre pendientes del 8.8 % y se calculó un LOD de  $0.26 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Si se considera la cantidad de Cd(II) introducido en las nanopartículas y estimado en un apartado anterior ( $50.3 \text{ mg Cd por g de CdTiPNPs}$ ), se tendría que este LOD estaría alrededor de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd(II) en disolución. En cuanto a los QDs, se ha determinado previamente que cada partícula puede tener alrededor de 100 átomos de Cd<sup>220</sup> (para un tamaño de 3.26 nm), por lo que el LOD estimado para los CdSe/ZnS utilizados en el [Capítulo 4](#) estaría, en términos de Cd(II), alrededor de  $35 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estos valores son del mismo orden de magnitud y sugieren que la capacidad de detección del metal es el parámetro más influyente en la detección de las nanopartículas, y, como es evidente, nanopartículas con mayor cantidad metálica podrían ser detectadas en menor concentración. Además, pone de manifiesto que para las TiPNPs, la misma cantidad de cadmio puede ser detectada evitando una etapa con digestión ácida.

### 8.3.2 Método de detección de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con plata en electrodos serigrafados

Con el objetivo de estudiar el comportamiento electroquímico de AgTiPNPs, se llevó a cabo el registro de medidas por voltamperometría cíclica de electrodos sin modificar y modificados con diferentes concentraciones de una disolución de  $2 \mu\text{L}$  de AgTiPNPs ( $0.2$ ,  $2$  y  $20 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) con un barrido de potenciales desde  $+0.6$  a  $-0.8$  V. En la [Figura 8.12](#) se

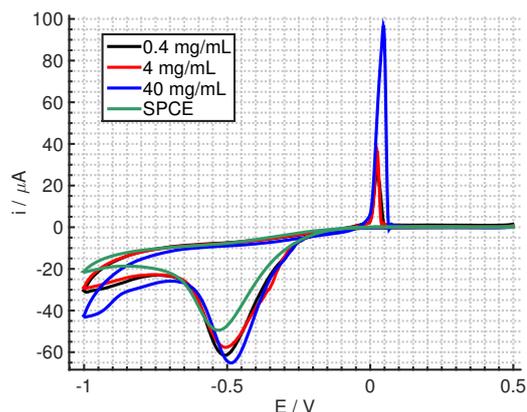


Figura 8.12: CVs para diferentes concentraciones de AgTiPNPs (0, 0.2, 2 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) en KI 0.1.

muestra el típico voltamperograma cíclico obtenido con una señal anódica de redisolución creciente con la concentración de AgTiPNPs en la superficie del electrodo. Un pequeño proceso de reducción se puede percibir justo antes del comienzo de la ORR. Por esta razón, la detección directa mediante el proceso de reducción no es muy adecuada, y es mucho más útil la utilización de la señal de redisolución.

Para la puesta a punto del método voltamperométrico para la detección de AgTiPNPs se optimizaron diferentes parámetros experimentales como la técnica utilizada en la etapa de redisolución (LSV, DPV o SWV), cuyo efecto se muestra en la [Figura 8.13a](#), el potencial y tiempo de deposición o el electrolito de fondo. En este caso, aunque anteriormente se mostró como un medio ácido era el más adecuado para la detección metálica de estas nanopartículas, en el caso de la plata una señal de fondo bastante elevada se obtiene en un medio ácido, como se puede ver en la [Figura 8.13b](#). Esto es debido a que es posible que la superficie electródica posea ciertas impurezas de plata<sup>14</sup>, que en un medio ácido pueden ser detectadas fácilmente. Por esa razón, se utilizó el siguiente electrolito de fondo con mayor señal que se obtuvo, yoduro potásico. Esta especie es muy interesante para la detección de plata tras su redisolución porque se forma una especie insoluble AgI y por tanto, favorece la oxidación de la plata depositada. Se utilizó voltamperometría de onda cuadrada usando un potencial de deposición de -0.2 V durante 180 s en KI 0.1 M. Todos los valores optimizados se muestran en la [Tabla 8.2](#). Tras la optimización de los parámetros, se llevó a cabo el registro de una recta de calibrado para diferentes cantidades de AgTiPNPs depositadas sobre los electrodos ([Figura 8.14b](#)). La señal analítica (corriente de pico de la reoxidación de la plata) fue directamente proporcional a la cantidad de AgTiPNPs ([Figura 8.14a](#)), dando lugar a una relación lineal en el rango entre 1 y 200 ng de AgTiPNPs

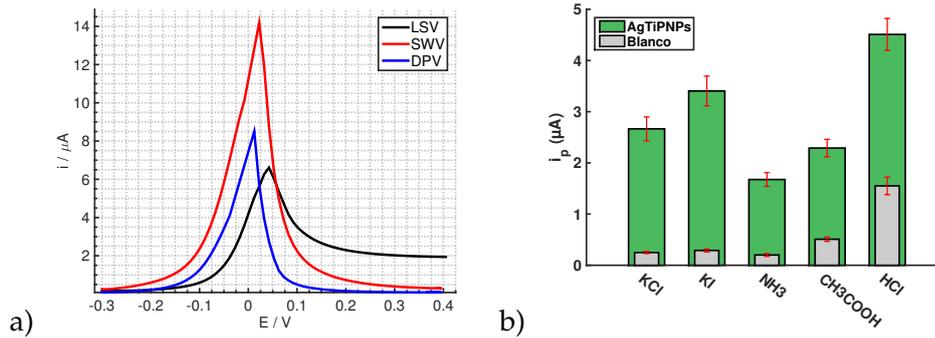


Figura 8.13: A) Respuesta de diferentes técnicas voltamperométricas (LSV, DPV y SWV) para 0.5 mg mL<sup>-1</sup> de AgTiPNPs tras la deposición de palta durante 30 s a -0.3 V. B) Relación entre señal/blanco de 25 μg mL<sup>-1</sup> de AgTiPNPs en diferentes medios electrolíticos, usando SWV con un potencial de deposición de -0.3 V durante 30 s.

| Tiempo de deposición | Potencial de deposición | Frecuencia | Amplitud |
|----------------------|-------------------------|------------|----------|
| 180 s                | -0.2 V                  | 30 Hz      | 10 mV    |
| Tiempo de equilibrio | Escalón de potencial    | E inicial  | E final  |
| 5 s                  | 5 mV                    | -0.2 V     | +0.4 V   |

Tabla 8.2: Parámetros optimizados para la detección electroquímica de AgTiPNPs.

(0.5 μg mL<sup>-1</sup> - 100 μg mL<sup>-1</sup>) según la siguiente ecuación:  $i_p (\mu\text{A}) = 0.28 + 0.12 (\mu\text{g mL}^{-1} \text{ de AgTiPNPs})$ ,  $R^2 = 0.998$ ,  $n = 3$ . Un límite de detección de 0.1 μg mL<sup>-1</sup> de AgTiPNPs y una reproducibilidad del 5.4 % ( $n = 3$ ) fueron obtenidos. Esta metodología voltamperométrica se compara en el [Capítulo 10](#) con una metodología electrocatalítica para la detección de estas mismas nanopartículas.

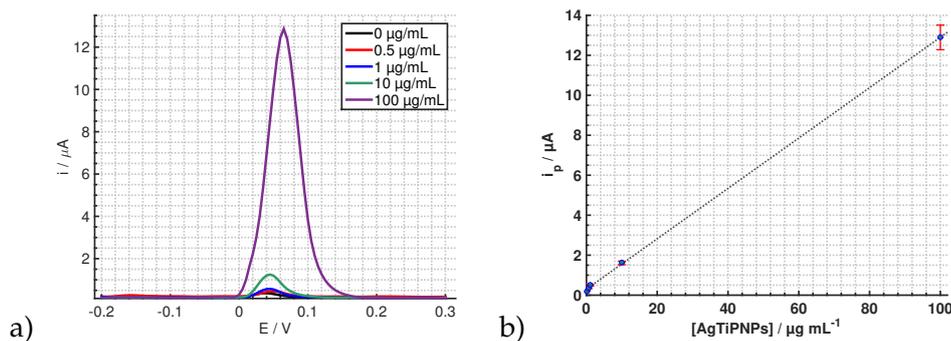


Figura 8.14: a) Voltamperogramas SWV para 0, 0.5, 1, 10 y 100 μg mL<sup>-1</sup> de AgTiPNPs. b) Recta de calibrado representando la corriente de pico frente a la concentración de AgTiPNPs.

### 8.3.3 Caracterización de electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre

Una de las aplicaciones electroanalíticas de las MTiPNPs que se describen en el [Capítulo 10](#) es la determinación de glucosa con electrodos serigrafiados de carbono modificados con una película de CuTiPNPs. Por esta razón, se estudió el comportamiento electroquímico general de una tarjeta serigrafiada de carbono de 8 canales tras modificar los electrodos de trabajo con un recubrimiento completo de 4  $\mu\text{L}$  de una dispersión de 2  $\text{mg mL}^{-1}$  de CuTiPNPs utilizando técnicas voltamperométricas y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Se utilizó una disolución de 5  $\text{mM}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  en 0.1  $\text{M}$   $\text{KCl}$  0.1  $\text{M}$  y se registraron los voltamperogramas cíclicos desde 0 hasta +0.7  $\text{V}$  a varias velocidades de barrido (10, 25, 50, 100 y 250  $\text{mV s}^{-1}$ ) para estudiar el comportamiento de esta especie redox modelo. La respuesta voltamperométrica se muestra en la [Figura 8.15](#). Los típicos procesos anódico y catódico del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  se observan en los voltamperogramas y la corriente de pico aumentó linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Este hecho significa que el proceso está controlado por la transferencia de masa mediante una difusión lineal, de la misma forma que ocurre para SPCEs sin modificar. Por tanto, parece que la superficie porosa no parece tener una gran influencia en el control limitante de la reacción, incluso con el recubrimiento y material poroso que se encuentra en el electrodo. Se empleó la ecuación de Randles-Sevcik descrita en la introducción (ecuación [1.29](#)) con el objetivo de estimar el área electroactiva del electrodo, utilizando el coeficiente de difusión para el ferrocianuro ( $0.67 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  en  $\text{KCl}$  0.1  $\text{M}$ )<sup>281</sup>. El área electroactiva para los SPCEs modificados con CuTiPNPs fue de  $3.4 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ , menor que el área estimada para un electrodo sin modificar ( $4.6 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ ). La modificación de la superficie electródica con un material semiconductor como fosfato de titanio tiene un efecto negativo en la cantidad del área electródica involucrada en la transferencia electrónica. Aunque un material semiconductor podría intervenir directamente en la transferencia electrónica, como ocurre con los quantum dots, no parece ser el caso para las MTiPNPs ya que se observan unos procesos electroquímicos a un potencial similar que para el electrodo sin modificar. Por tanto, parece que la transferencia electrónica se realiza directamente a través del electrodo de carbono. La disminución del área electroactiva es probablemente debido a que parte de la superficie electródica no se encuentre disponible por el bloqueo del material semiconductor. Sin embargo, la naturaleza porosa del material y la no homogeneidad de la película formada sobre el electrodo (como se observa en una imagen SEM

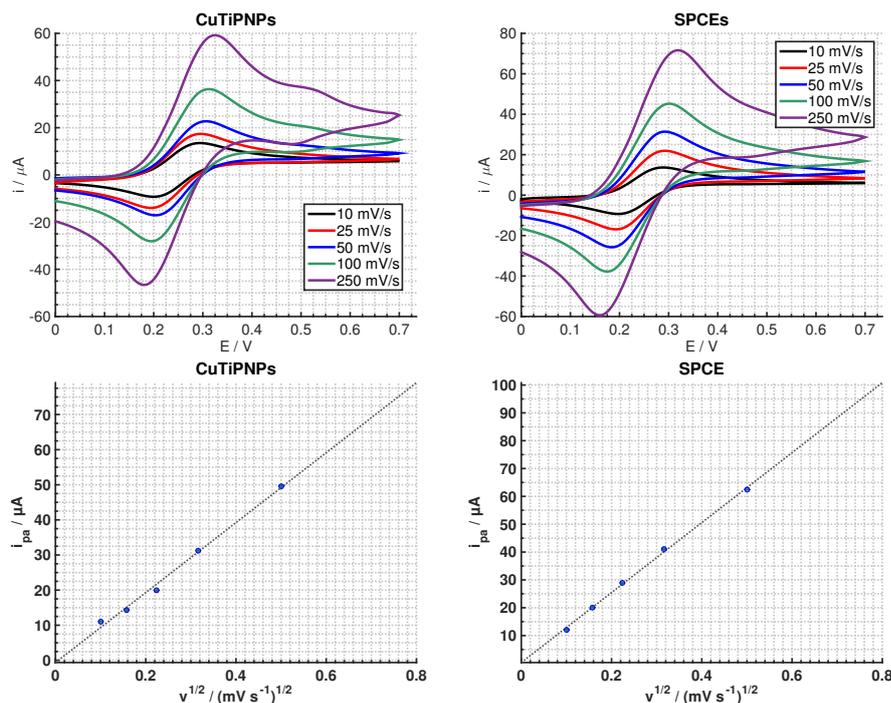


Figura 8.15: CVs de 5 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  en electrodos modificados con CuTiPNPs y sin modificar. Relación entre la corriente de pico anódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

de las AgTiPNPs presentada en el [Capítulo 10](#)) ayuda a prevenir que toda la superficie esté bloqueada para la transferencia de carga y la disminución del área no es tan elevada como se podría esperar. Esta circunstancia es importante cuando se utilice electrodos nanoestructurados para aplicaciones electrocatalíticas ya que es posible la transferencia electrónica incluso con la película recubriendo el electrodo.

Para conocer un poco mejor la transferencia electrónica entre la especie redox y el electrodo modificado con la película semiconductor, se llevaron a cabo medidas por EIS de los electrodos modificados con CuTiPNPs y electrodos sin modificar ([Figura 8.16a](#)), utilizando una disolución de 5 mM para el par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Los resultados obtenidos se ajustaron al típico circuito equivalente de Randles. Un aumento significativo en la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ) se encontró para el electrodo modificado con CuTiPNPs ( $956 \pm 112 \Omega$ ) en comparación al electrodo sin modificar ( $380 \pm 52 \Omega$ ), como indica el aumento significativo en el semicírculo de la respuesta impedimétrica. Estos resultados muestran claramente que la transferencia electrónica está impedida por la película del material semiconductor, algo que no estaba muy claro en las medidas voltamperométricas, causando un incremento en la  $R_{ct}$ , que indica cierta interacción entre la película semiconductor y el

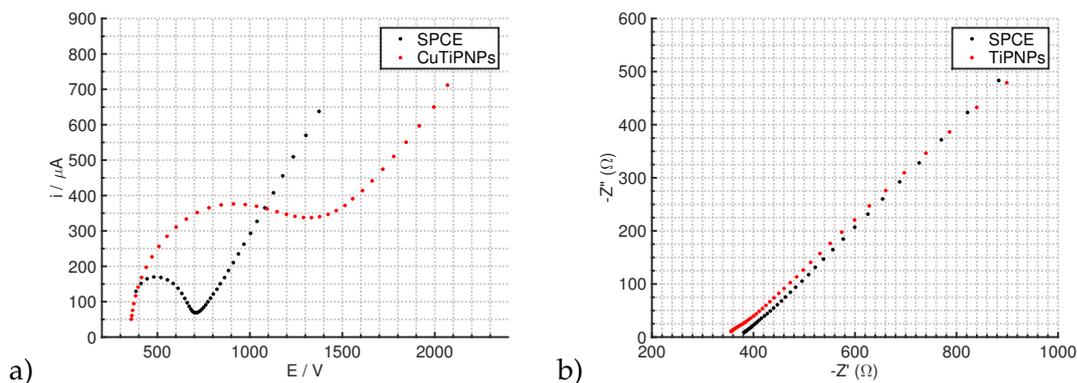


Figura 8.16: Representación Nyquist de la respuesta impedimétrica obtenida para electrodos modificados con CuTiPNPs y sin modificar para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (a) y en electrodos modificados con TiPNPs y sin modificar para  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ .

electrodo. Es probable que esta menor transferencia electrónica sea debida a una posible repulsión de los aniones de la especie entre los poros de las nanopartículas, ya que los grupos fosfato que queden libre puede tener cierta carga parcial negativa (como parece confirmarse por las medidas del potencial  $\zeta$  que se describen en el próximo capítulo). Esta carga parcial negativa impediría el acceso del par redox cargado negativamente, e inhibiría la transferencia electrónica. Este hecho se constata utilizando el par redox  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  (con carga positiva) para hacer las medidas de EIS, en las que se encuentra una  $R_{ct}$  del mismo orden para un electrodo modificado con TiPNPs ( $30 \pm 2 \Omega$ ) y sin modificar ( $24 \pm 3 \Omega$ ) como se ilustra en la Figura 8.16b. Por otro lado, se calculó la capacitancia de la doble capa ( $C_{dl}$ ) para ambos electrodos (sin modificar y con CuTiPNPs) y se estimó una  $C_{dl}$  de  $1.07 \pm 0.02$  and  $4.4 \pm 0.2 \mu\text{F cm}^{-2}$ , respectivamente. La modificación de la superficie de carbono con una película de un material mesoporoso parece aumentar la  $C_{dl}$ . Este incremento puede deberse, en primer lugar a la diferente constante dieléctrica de estas nanopartículas en comparación con la disolución y, podría ser debida también a la naturaleza porosa y cargada de estas nanopartículas que puede influir en la reorganización de los iones de la doble capa, aumentando la capacidad de almacenar carga eléctrica en la interfase electrodo/disolución. Esta caracterización electroquímica ha proporcionado información sobre el comportamiento de estas nanopartículas en la superficie de un electrodo.

#### 8.4 EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON METALES PARA DETECCIÓN MULTIANALITO

En este apartado se evalúan las MTiPNPs más idóneas para su utilización como marca en un biosensor electroquímico multianalito. Para ello, se ha considerado el medio electrolítico más adecuado y la elección de dos MTiPNPs que presenten una alta señal analítica y adecuada selectividad para resolver sus procesos voltamperométricos. Además, se valora la posibilidad de utilizar una superficie electródica nanoestructurada para mejorar la sensibilidad de esta detección. Por último, se optimizan los parámetros experimentales más importantes, y se lleva a cabo una calibración simultánea de las dos MTiPNPs elegidas.

##### 8.4.1 Elección del medio adecuado

Para la elección del medio electrolítico más adecuado se utilizaron los resultados obtenidos en el estudio presentado en un apartado anterior. En ese caso, se observó como un medio ácido era capaz de liberar una gran cantidad del metal presente en la nanopartícula a la disolución, mejorando su detección electroquímica. Por lo que en términos de sensibilidad, la utilización de un medio ácido representa la mejor opción. Esto es importante ya que en un ensayo multianalito va a existir una competición entre ambos reactivos por los sitios de unión, por lo que una menor densidad de reactivo marcado se va a unir al sensor, y en consecuencia, es necesario una marca más sensible para obtener resultados satisfactorios. En cuanto a los resultados obtenidos para el potencial de pico de la redisolución metálica, para el caso del HCl, se obtuvo una menor resolución para todos los metales en comparación a otros ácidos más oxidantes como  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HNO}_3$ . La resolución de los procesos con estos dos ácidos fue similar, ya que los procesos de redisolución aparecían a un potencial muy parecido para ambos, por lo que se decidió utilizar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M debido a una corriente de pico ligeramente mayor.

##### 8.4.2 Evaluación de la multidetección

A continuación se llevó a cabo la evaluación mediante voltamperometría de onda cuadrada (con un barrido simple, sin electrodeposición) de todas las MTiPNPs utilizando menores concentraciones que en el estudio por CV y utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M. Para ello,

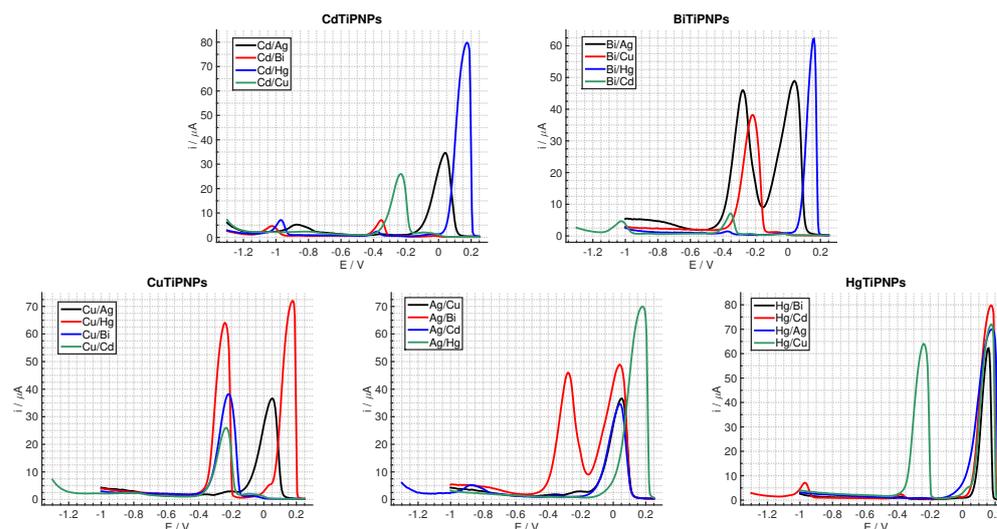


Figura 8.17: Voltamperogramas SWV para mezclas binarias de las diferentes MTiPNPs.

se llevó a cabo la modificación de la superficie electródica con 2  $\mu\text{L}$  de 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  de MTiPNPs en diferentes mezclas (binarias, terciarias, cuaternarias) de todas las nanopartículas sintetizadas, además de manera individual para localizar cada proceso de redisolución. En la [Figura 8.17](#) se muestran los voltamperogramas de las mezclas binarias, y en la [Figura 8.18](#) se muestran los voltamperogramas individuales. Como se se observa en esta última figura, el proceso de redisolución de cada MTiPNPs aparece a los siguientes potenciales de pico por este orden: BiTiPNPs (-0.35 V), CuTiPNPs (-0.25 V), AgTiPNPs (-0.1 V) y HgTiPNPs (+0.2V), mientras que las CdTiPNPs en estas condiciones no generan una señal observable (aunque sí aparece en algunas de las mezclas binarias). Por tanto, evaluando las mezclas binarias parece claro que los procesos de BiTiPNPs/CuTiPNPs y AgTiPNPs/HgTiPNPs no pueden ser resueltos de manera simultánea. Considerando estos hechos y las señales analíticas obtenidas, se eligen CuTiPNPs y HgTiPNPs como las nanopartículas más adecuadas para ser utilizadas en un biosensor electroquímico multi-analito.

### 8.4.3 Efecto de la nanoestructuración electródica

Tanto la detección electroquímica de Cu como de Hg se ven fuertemente mejoradas en presencia de nanopartículas de oro (AuNPs) como se ha descrito frecuentemente en la literatura<sup>92</sup>. Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de utilizar una superficie electródica modificada con AuNPs. Esta nanoestructuración se lleva a cabo mediante la electrodeposi-

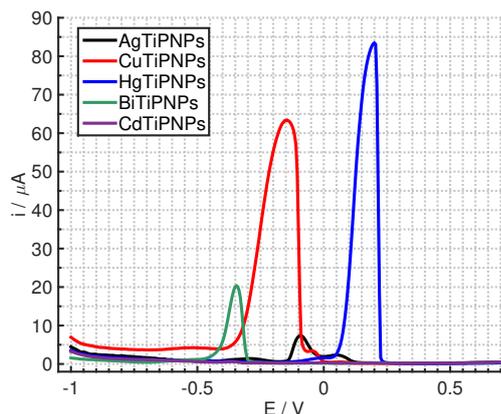


Figura 8.18: Voltamperogramas SWV para disoluciones individuales de MTiPNPs.

ción sobre electrodos serigrafados a partir de  $\text{AuCl}_4^-$  según una metodología previamente publicada en nuestro grupo de investigación<sup>93</sup>, aplicando una corriente negativa capaz de reducir el oro iónico y generar oro elemental sobre la superficie de electrodos serigrafados.

Aunque se encontró una mejora significativa de la señal obtenida, se sospechaba que las MTiPNPs se adsorbieran de forma no específica sobre la superficie de las AuNPs, haciendo difícil su utilización en los estudios posteriores en biosensores. Por tanto, se realizó un estudio para evaluar esta adsorción inespecífica en un sistema imitando un biosensor que consistía en lo siguiente: tras la nanoestructuración del electrodo, se bloqueo la superficie durante 30 minutos con caseína (al 2%), un agente bloqueante muy eficiente como se comprobó anteriormente. Tras lavar, se dejó una disolución de las MTiPNPs durante 30 minutos en contacto con el electrodo (a pH fisiológico, PBS pH 7.0). A continuación se lava con PBST, y se mide la señal voltamperométrica utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M como medio electrolítico, observándose un proceso correspondiente a la redisolución metálica de las MTiPNPs, que sugiere la adsorción de estas nanopartículas en un electrodo nanoestructurado (algo que no ocurre con un SPCE sin modificar con AuNPs).

Para comprobar si la adsorción era debida a las TiPNPs en sí, se llevó a cabo un experimento de química general. En un microtubo se añadió una dispersión acuosa de TiPNPs, un pequeño volumen de  $\text{AuCl}_4^-$ , y a continuación  $\text{NaBH}_4$  para llevar a cabo la reducción del Au(III). Como control se realiza el mismo experimento en ausencia de las TiPNPs. Los resultados muestran que la disolución toma un color oscuro (grisáceo) en ausencia de TiPNPs pero se pone de un color rojizo en presencia de TiPNPs (ver la Figura 8.19), algo que parece indicar la generación de nanopartículas de oro estabilizadas por las TiPNPs y

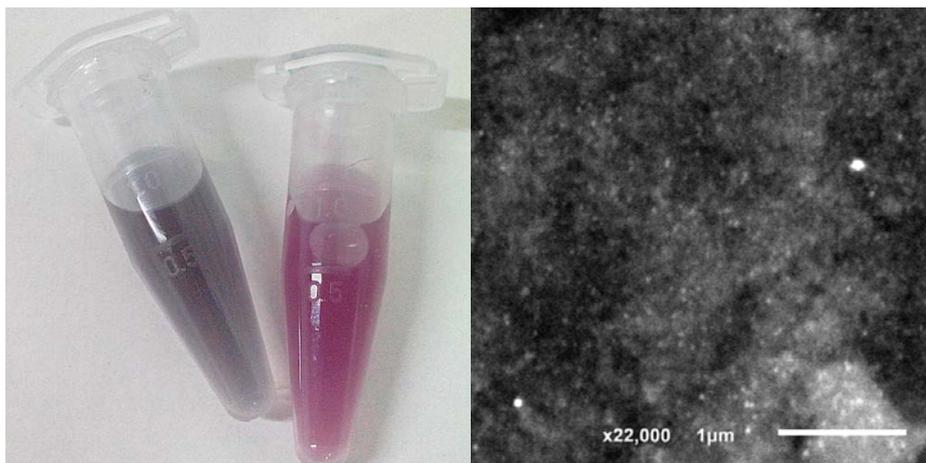


Figura 8.19: Imagen de las disoluciones generadas tras poner en contacto  $\text{HAuCl}_4$  y  $\text{NaBH}_4$  en ausencia y presencia de TiPNPs. Imagen SEM del material híbrido obtenido AuNPs/-TiPNPs.

| TiPNPs        | TiPNPs-AuNPs  | Au(III) + $\text{NaBH}_4$ |
|---------------|---------------|---------------------------|
| $44 \pm 6$ nm | $75 \pm 7$ nm | $> 900$ nm                |

Tabla 8.3: Tamaños de las nanopartículas obtenidas en el proceso mediante medidas por DLS.

que demuestra la interacción entre los dos tipos de nanopartículas. Esta interacción es lo suficientemente fuerte para ser capaz de estabilizar los núcleos de oro generados, probablemente gracias a los grupos fosfato de la nanopartícula que le proporcionan una cierta carga negativa en la superficie. La presencia de nanopartículas de mayor tamaño se determina con medidas por dispersión dinámica de luz (DLS), obteniendo nanopartículas con una distribución relativamente homogénea pero de mayor tamaño que las TiPNPs (ver [Tabla 8.3](#)), y es posible observar las AuNPs unidas a las TiPNPs mediante imágenes de SEM, como se ilustra en la figura citada. Por tanto, se descartó la utilización de una superficie electródica nanoestructurada con AuNPs para llevar a cabo la determinación voltamperométrica de las HgTiPNPs y CuTiPNPs.

#### 8.4.4 *Detección simultánea de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre y mercurio*

Tras la elección de las MTiPNPs, se llevó a cabo la optimización de la metodología de detección utilizando SWV. Se eligieron unas condiciones para la onda cuadrada capaz de resolver ambos picos (20 Hz como frecuencia, 25 mV como amplitud) y se evaluó el efecto

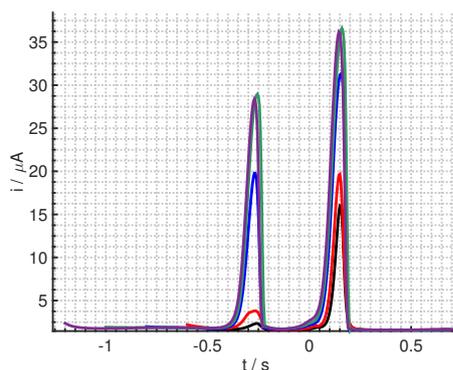


Figura 8.20: Efecto del potencial de deposición en la respuesta voltamperométrica de una mezcla de CuTiPNPs y HgTiPNPs.

que tenía la electrodeposición en la señal analítica obtenida. Para ello, se registraron varios voltamperogramas a diferentes potenciales y tiempos de deposición, para un electrodo modificado con 2  $\mu\text{L}$  de una mezcla de HgTiPNPs y CuTiPNPs (en concentración de  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En la [Figura 8.20](#) se muestra el efecto del potencial de deposición en la respuesta obtenida, y se eligió un potencial de  $-1 \text{ V}$  aplicado durante 30 s como condiciones más óptimas para llevar a cabo la preconcentración metálica.

Tras ver el efecto de estos parámetros se registraron voltamperogramas para diferentes concentraciones de MTiPNPs ( $0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se obtuvo un rango dinámico para las CuTiPNPs entre  $0.01$  y  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que fue de  $0.01$  a  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  para las HgTiPNPs. Las rectas de calibrado siguieron las ecuaciones siguientes:  $i_p (\mu\text{A}) = 133 (\pm 5) [\text{CuTiPNPs}] (\mu\text{g mL}^{-1}) - 0.1 (\pm 0.2)$ , ( $R^2=0.992$ ). para las CuTiPNPs e  $i_p (\mu\text{A}) = 193 (\pm 1) [\text{HgTiPNPs}] (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0.5 (\pm 0.1)$  ( $R^2 = 0.9994$ ) para las HgTiPNPs, con límites de detección estimados de  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.008 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Sin duda, la mayor cantidad metálica que se introduce en estas nanopartículas unido a una mayor facilidad de la detección, permite su determinación en concentraciones mucho menores que para el caso de las AgTiPNPs o CdTiPNPs antes evaluadas, incluso con menores tiempos de deposición, conduciendo a unas nanopartículas con capacidad de multidetección muy sensibles. Las rectas de calibrado muestran una mejora en la sensibilidad de alrededor de 3 órdenes de magnitud respecto a las AgTiPNPs y de casi 2 órdenes respecto a las CdTiPNPs. Las CdTiPNPs han sido las más utilizadas de este tipo de nanopartículas para detección en biosensores, por lo que, estos resultados sugieren que las HgTiPNPs y las CuTiPNPs pueden producir una mejora significativa en las características analíticas de un biosensor utilizando estas nanopartículas como marca en comparación a las de CdTiPNPs.

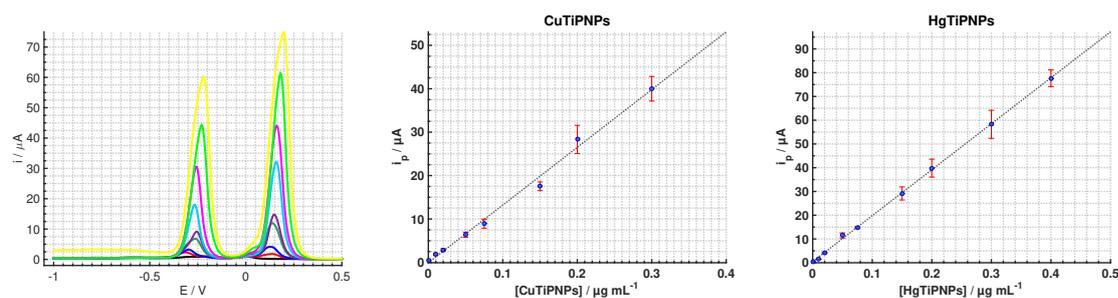


Figura 8.21: Respuesta voltamperométrica para concentraciones crecientes de CuTiPNPs y Hg-TiPNPs y rectas de calibrado asociadas a cada respuesta.

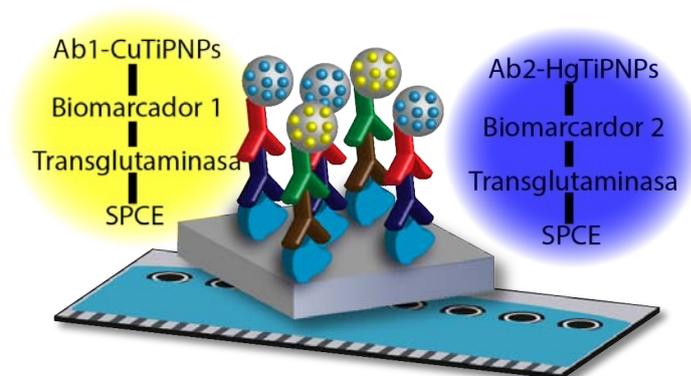
## 8.5 CONCLUSIONES

En este capítulo se han caracterizado con técnicas electroquímicas diversas nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales electroactivos. El estudio voltamperométrico con diferentes medios electrolíticos de medida puso de manifiesto un efecto claro de este medio en la capacidad de extracción del metal para su preconcentración electródica, siendo los medios ácidos los más adecuados para tal fin. La determinación de la cantidad metálica en las nanopartículas muestra un gran rendimiento de intercambio iónico para el Cu, mientras que es similar para Hg, Cd y Bi. Una peor respuesta de las AgTiPNPs unido a un cambio de color físico es coherente con la aparición de nanopartículas de plata, tras la reducción espontánea de los iones plata de las AgTiPNPs. Por otro lado, se evalúa electroquímicamente la capacidad de diferentes aniones para mejorar la carga metálica en las nanopartículas, mostrando una importante capacidad de los aniones que generen ácidos débiles de extraer los protones de las nanopartículas, y por consiguiente, introducir una mayor cantidad metálica. Los estudios de estabilidad de las MTiPNPs muestran que son estables al menos durante dos meses almacenadas en forma sólida en un recipiente hermético, mientras que sufren una derivatización cuando se almacenan en disolución. Además, se optimizaron métodos de detección electroquímica de AgTiPNPs y CdTiPNPs. Se evaluó la posibilidad de usar dos MTiPNPs de manera simultánea para su utilización en un ensayo multianalito, siendo las CuTiPNPs y HgTiPNPs, las más adecuadas, tanto en términos de resolución como de sensibilidad. La evaluación de las características analíticas de los métodos desarrollados desvelan una mejora significativa en la sensibilidad para detectar un menor número de MTiPNPs utilizando CuTiPNPs y HgTiPNPs, por lo que se espera obtener una marca de detección mucho más adecuada que las CdTiPNPs. Por otro lado, se evaluó el efecto en la transferencia electrónica de un electrodo modificado con un

recubrimiento de CuTiPNPs, sugiriendo que el material semiconductor bloquea parte de la superficie, pero su naturaleza porosa deja traspasar parte de la especie redox de interés. Además, se encuentra una disminución en la transferencia electrónica para especies cargadas negativamente, algo que parece ocurrir por la carga negativa superficial de los grupos fosfato de la nanopartícula. El trabajo desarrollado en este capítulo proporciona nueva información sobre el comportamiento electroquímico de las nanopartículas de fosfato de titanio *core-shell* modificadas con metales electroactivos.

# EVALUACIÓN DE MTiPNPS COMO MARCA ELECTROQUÍMICA DE BIOSENSORES

---



## 9.1 INTRODUCCIÓN

Las MTiPNPs ya habían sido utilizadas como marca electroquímica de biosensores por otros autores. Sin embargo, en esos trabajos se utilizaron electrodos convencionales de carbono vítreo para llevar a cabo la detección, además de usar celdas electroquímicas de volumen elevado (~3 mL). Por otro lado, la funcionalización de estas nanopartículas con especies biológicas se ha descrito siguiendo un procedimiento que consiste en el atrapamiento polimérico de la nanopartícula y su unión covalente posterior. MTiPNPs de Cd, Pb o Zn fueron empleadas para la detección en biosensores, aunque estos metales podrían no ser los más adecuados para conseguir una medida selectiva y sensible, como se ha puesto de manifiesto en el capítulo anterior.

Por estas razones, el objetivo de este capítulo fue la evaluación de nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales, caracterizadas y cuyos métodos de detección fueron optimizados en el capítulo anterior, como marca de biosensores electroquímicos

desechables utilizando tarjetas serigrafiadas de 8 canales. Además, un nuevo método de funcionalización es evaluado con el objetivo de simplificar el método descrito en la literatura y obtener una interacción directa entre las nanopartículas y el material proteico. Por último, dos tipos de MTiPNPs con una alta eficacia de detección son utilizadas para llevar a cabo un biosensor multianalito.

En primer lugar se lleva a cabo la funcionalización con neutravidina de estas nanopartículas utilizando dos métodos. Para las CdTiPNPs se siguió el método propuesto en la literatura que consistía en diferentes etapas de reacción (atrapamiento polimérico, reacción covalente con un entrecruzador, y finalmente reacción covalente con la proteína). Para las TiPNPs de Hg y Cu, se diseñó un nuevo método para su biofuncionalización con el objetivo de conseguir una reacción más directa entre los grupos fosfato de la nanopartícula y la proteína, con menor número de etapas de reacción y más sencilla. Tras estos procesos, se llevó a cabo el desarrollo de un biosensor monoanalito y de un biosensor multianalito en tarjetas serigrafiadas de carbono. Las CdTiPNPs fueron utilizadas con el fin de optimizar una metodología para la detección de biotina utilizando electrodos modificados con albúmina biotinilada y CdTiPNPs funcionalizadas con neutravidina. Aunque las CdTiPNPs no fueron las que mejores características de detección electroquímica presentaron según los resultados del capítulo anterior, se eligieron con la finalidad de poder comparar con los trabajos publicados previamente en la literatura en los que se utilizan estas nanopartículas, y además, para una comparación más directa con los QDs. Aunque los QDs son nanopartículas de otra naturaleza, la detección electroquímica se lleva a cabo mediante la determinación del Cd(II) liberado, y por tanto, se podría hacer una equiparación a los resultados obtenidos en el [Capítulo 5](#).

A continuación, se valoró la capacidad de detección multianalito con las CuTiPNPs y HgTiPNPs en un biosensor algo más complejo para la determinación simultánea de biomarcadores de la enfermedad celíaca, como en el [Capítulo 6](#): anticuerpos IgA e IgG anti-transglutaminasa. Se decidió utilizar el procedimiento multi-etapa descrito en ese capítulo por ofrecer mejores resultados, exceptuando que las MTiPNPs funcionalizadas con neutravidina deben reaccionar, previamente y por separado, con anticuerpos anti-IgA y anti-IgG biotinilados para evitar la reacción cruzada de las marcas. Tras la optimización de las condiciones, se evaluaron las características analíticas del biosensor multianalito.

| E deposición | t deposición | E inicial | E final | Frecuencia | Amplitud | Escalón |
|--------------|--------------|-----------|---------|------------|----------|---------|
| -1.3 V       | 300 s        | -1.3 V    | -0.6 V  | 20 Hz      | 30 mV    | 2 mV    |

Tabla 9.1: Condiciones experimentales optimizadas para la detección electroquímica de las Cd-TiPNPs.

## 9.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 9.2.1 Bioensayo para la detección de biotina usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cadmio como marca

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE AFINIDAD

Los SPCEs de 8 canales fueron lavados con reguladora PBS 0.1 M pH 7 y se dejaron secar para generar una superficie hidrofílica según el procedimiento explicado en el [Capítulo 6](#). Después, una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de una disolución de albúmina biotinilada con una concentración de 0.25  $\text{mg mL}^{-1}$  (en PBS) fue depositada recubriendo toda la celda electroquímica de cada canal de la tarjeta serigrafiada y se almacenó a 4  $^{\circ}\text{C}$  *overnight* hasta secado completo. Tras lavado con PBS, se llevó a cabo una etapa de bloqueo añadiendo 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de BSA (2.0 % en Tris) y se dejó en contacto durante 30 minutos. Tras un nuevo lavado con PBS, se llevó a cabo la reacción de afinidad con 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de CdTiPNPs-NTV (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS) para la optimización de la metodología o de una mezcla de CdTiPNPs-NTV y biotina para el ensayo competitivo. En la [Figura 9.1](#) se muestra un esquema del formato de biosensor utilizado para el ensayo competitivo (el mismo esquema se utilizó para la optimización, pero sin la adición de biotina libre en la etapa de reconocimiento).

#### MEDIDA ELECTROQUÍMICA

Tras la reacción biológica, la tarjeta serigrafiada fue lavada con PBST (0.05 % Tween) y  $\text{H}_2\text{O}$  y se llevó a cabo la metodología de medida electroquímica para las CdTiPNPs optimizada en el [Capítulo 8](#). Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora de acetato 0.1 M pH 4.5 con una concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Bi(III) y se llevó a cabo la detección electroquímica mediante voltamperometría de redisolución anódica con pulsos de onda cuadrada y las condiciones descritas en la [Tabla 9.1](#).

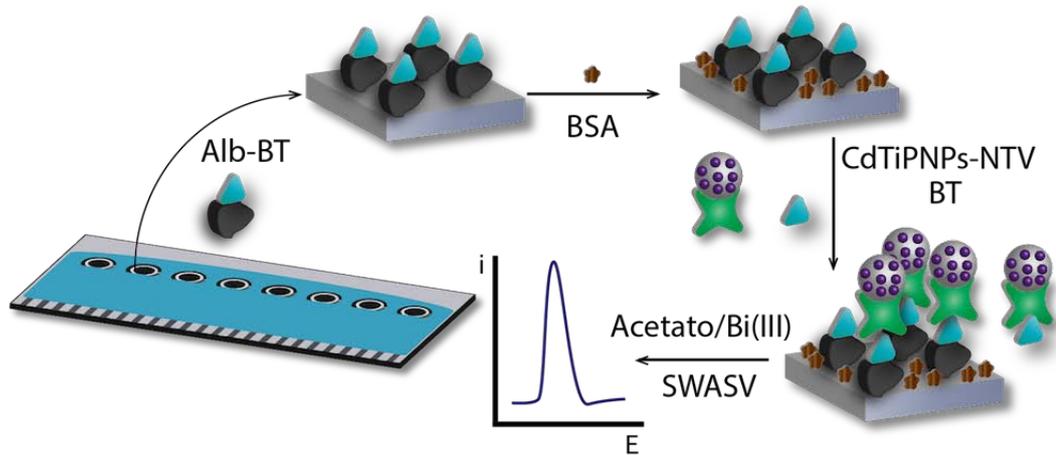


Figura 9.1: Esquema del biosensor competitivo para la detección de biotina usando CdTiPNPs como marca.

### 9.2.2 Bioensayo de multidetección de anticuerpos IgG/IgA anti-transglutaminasa usando nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre y mercurio como marca

#### PROCEDIMIENTO DEL INMUNOSENSOR

Los SPCEs de 8 canales fueron lavados con reguladora PBS y se dejaron secar para generar una superficie hidrofílica según el procedimiento explicado en el [Capítulo 6](#). Después, una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de una disolución de transglutaminasa tisular con una concentración de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  (en PBS) fue depositada recubriendo toda la celda electroquímica de cada canal de la tarjeta serigrafiada y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  *overnight* hasta secado completo. Tras lavado con PBS, se llevó a cabo la reacción de reconocimiento tras incubar durante 60 minutos 25  $\mu\text{L}$  de una disolución generada al mezclar las disoluciones séricas de dos kits comerciales para la detección de anti-tTG IgA e IgG en una relación 1:1:0.2 (IgA:IgG:PBS). Tras un nuevo lavado con PBS, 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de anti-H-IgA-BT-NTV-HgTiPNPs y anti-H-IgG-BT-NTV-CuTiPNPs en PBS se incubó con el sensor durante 75 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Para obtener esta mezcla se hizo reaccionar durante 50 minutos y por separado anti-H-IgA-BT y HgTiPNPs-NTV por un lado, y anti-H-IgG-BT y CuTiPNPs-NTV por otro lado, en un microtubo de *low-binding*. Este proceso se llevó a cabo de manera simultánea a la etapa anterior del inmunosensor con el objetivo de ahorrar tiempo. La concentración de MTiPNPs utilizada fue de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que una concentración de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  fue utilizada para los anticuerpos biotinilados. El volumen de estas disoluciones dependió del número de ensayos planeados, pero normalmente estuvo por encima de 500  $\mu\text{L}$ . Después

| E deposición | t deposición | E inicial | E final | Frecuencia | Amplitud | Escalón |
|--------------|--------------|-----------|---------|------------|----------|---------|
| -1.0 V       | 30 s         | -1.0 V    | +0.7 V  | 20 Hz      | 25 mV    | 2 mV    |

Tabla 9.2: Condiciones experimentales para la detección electroquímica de la mezcla CuTiPNPs y HgTiPNPs.

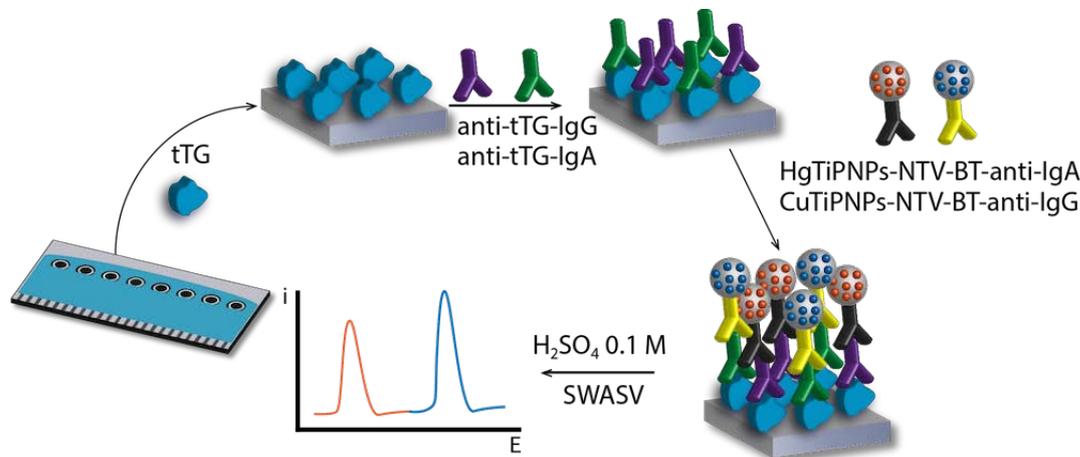


Figura 9.2: Esquema del biosensor multianalito para la detección de anti-tTG IgA e IgG usando HgTiPNPs y CuTiPNPs como marca.

de la reacción, una pequeña cantidad de BSA fue añadida a estas disoluciones (concentración final de 0.25 %) con el objetivo de eliminar posibles adsorciones inespecíficas en el inmunosensor. A continuación, se mezclaron las diluciones para ambos anticuerpos marcados en relación 1:1, y se colocó una gota de 25  $\mu\text{L}$  en la superficie eléctrica durante 60 minutos. En la [Figura 9.2](#) se muestra un esquema del formato y etapas de biosensor desarrollado.

#### MEDIDA ELECTROQUÍMICA

Tras la reacción biológica, la tarjeta serigrafiada fue lavada con PBST y  $\text{H}_2\text{O}$  y se llevó a cabo la metodología de medida electroquímica para la mezcla de las HgTiPNPs y CuTiPNPs optimizada en el [Capítulo 8](#). Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M y se llevó a cabo la detección electroquímica mediante voltamperometría de reducción anódica con pulsos de onda cuadrada y las condiciones descritas en la [Tabla 9.2](#).

### 9.3 FUNCIONALIZACIÓN PROTEICA DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON METALES

La funcionalización de MTiPNPs con biomoléculas se llevó a cabo usando dos metodologías: en primer lugar se siguió una metodología descrita en la bibliografía<sup>280</sup>, y en segundo lugar, se desarrolló un nuevo procedimiento con el objetivo de unir la proteína con las nanopartículas de forma más directa y con una reacción más simple. La biomolécula elegida para llevar a cabo la funcionalización fue la neutravidina. La primera metodología se lleva a cabo directamente con esta proteína. Para el desarrollo de la metodología directa, se evaluó, en primer lugar, la unión con una amina primaria como octilamina y a continuación, con albúmina. De esta manera, se pudo caracterizar en más profundidad la reacción entre las TiPNPs y los grupos amino de las moléculas, utilizando octilamina y una proteína de menor coste que la neutravidina, mientras es de esperar que la reacción siga un mecanismo similar. Cuando se caracterizó y comprobó la unión proteica con las MTiPNPs, se llevó a cabo la funcionalización con neutravidina para las aplicaciones bioanalíticas. Como se ha mencionado, este trabajo fue fruto de una colaboración, por lo que solamente se describirán a continuación, los resultados más relevantes con fines bioanalíticos que demuestren la unión de la proteína con las MTiPNPs.

La metodología de funcionalización por atrapamiento polimérico viene descrita con detalle en el [Capítulo 2](#), pero básicamente consiste en el atrapamiento polimérico de la nanopartícula con un polímero con grupos amino, y una reacción posterior con moléculas con grupos bifuncionales que hacen de puente con los grupos amino de la proteína. Como esta metodología fue descrita en varias publicaciones, no se llevó a cabo una caracterización exhaustiva, y solamente se comprobó la unión de la proteína a las nanopartículas evaluando el potencial  $\zeta$  y la distribución de tamaños de las nanopartículas (mediante dispersión dinámica de luz, DLS). Ambos parámetros fueron obtenidos en el mismo instrumento ([Capítulo 2](#)) pero con un fundamento diferente que se describe brevemente en el [Capítulo B](#). En la [Figura 9.3](#) se muestra la distribución de tamaños para CdTiPNPs antes de la unión y después de la unión con neutravidina. Se observa un aumento en el diámetro hidrodinámico medio desde  $45 \pm 1$  nm hasta  $80 \pm 5$  nm.<sup>1</sup>, mientras que el potencial  $\zeta$  pasa de  $-26.5 \pm 0.2$  mV para las CdTiPNPs sin proteína a  $-36.4 \pm 0.8$  mV cuando se encuentran unidas. Estos resultados parecen confirmar la unión con la proteína

<sup>1</sup> Hay que considerar que el DLS proporciona información sobre el radio hidrodinámico, y por eso se puede encontrar una pequeña diferencia con los datos obtenidos mediante TEM.

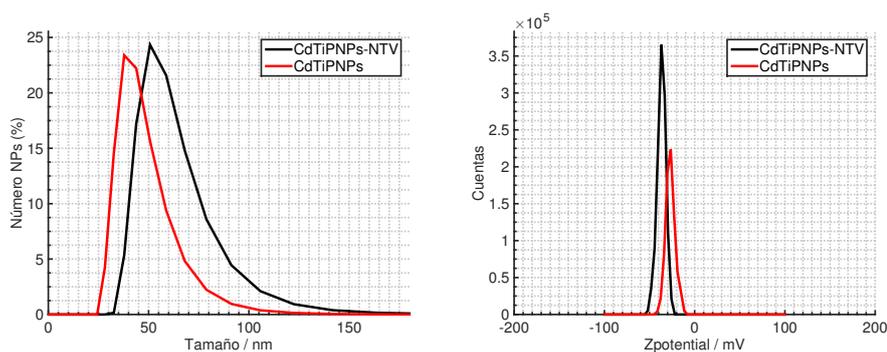


Figura 9.3: Distribución de tamaños y potencial  $\zeta$  para las CdTiPNPs antes (rojo) y después (negro) de la funcionalización con neutravidina mediante el atrapamiento polimérico.

por el aumento del tamaño y por la mejora de la estabilidad en disolución. Cabe destacar que las CdTiPNPs sin proteína ya presentan un potencial  $\zeta$  negativo, consecuencia de los grupos fosfato que se encuentran en el recubrimiento externo de las nanopartículas, aunque el potencial de  $-26.5$  mV está en el límite del valor que se considera estable (a partir de  $\pm 30$  mV). El resultado de esto es la precipitación de las nanopartículas cuando se dejan un tiempo en reposo, mientras que tras la funcionalización, aunque también acaban precipitando, se mantienen durante más tiempo en suspensión. Este efecto también depende de la concentración de las TiPNPs, con mayores concentraciones resultando en una precipitación más rápida.

Aunque este método parece ser válido para llevar a cabo la biofuncionalización, el procedimiento conlleva varias etapas de reacción, entre las cuales se debe llevar a cabo una separación de los productos que no reaccionan mediante el proceso cíclico de precipitación/lavado/redispersión (que se debe hacer al menos tres veces para asegurar la separación). Estos procesos son complejos y no es de extrañar que parte de las nanopartículas pudieran perderse en cada una de estas etapas, ya sea una precipitación no completa o por adsorciones muy fuertes en las paredes del material utilizado que evitaran su posterior redispersión. Además, estos procesos consumen mucho tiempo: solamente las primeras etapas (atrapamiento polimérico y unión con glutaraldehído) consumen, prácticamente, el tiempo de trabajo de una mañana completa. Por esta razón, se buscó la posibilidad de una unión proteica más directa a las nanopartículas y con un procedimiento más simple. La superficie de las TiPNPs presentan una gran cantidad de grupos fosfatos ácidos que podrían funcionar de manera similar a un grupo carboxílico. Por un lado, el fósforo puede presentar una carga parcial positiva, y podría ser atacado por un nucleófilo, mientras que a su vez, los oxígenos de los grupos OH presentan una carga negativa si se encuentran

desprotonados, por lo que podrían actuar como nucleófilos y reaccionar con una especie electrófila, o por otro lado, formar un complejo (o unión electrostática) con una especie cargada positivamente, como parece ser el caso con los metales que se introducen en su estructura mediante intercambio iónico. Por tanto, los grupos fosfato parecen tener una interesante versatilidad para unirse a compuestos como proteínas que presentan diferentes grupos funcionales. Tras una búsqueda bibliográfica se encontró un procedimiento utilizado para la funcionalización de grupos fosfato de ácidos nucleicos con proteínas mediante un enlace covalente utilizando EDC/imidazol como especie activadora (que funciona de manera similar al sistema NHS/EDC, ampliamente utilizado para funcionalizar grupos carboxilo). Por tanto, un posible mecanismo similar a esta reacción podría ocurrir al hacerse reaccionar con los grupos fosfato de las TiPNPs, como se muestra en el mecanismo propuesto ilustrado en la [Figura 2.13](#) del [Capítulo 2](#). Con este objetivo, se llevó a cabo la reacción de las TiPNPs, en primer lugar, con octilamina, una amina primaria con una cadena hidrocarbonada alifática, que podía ser fácilmente detectado mediante espectroscopía IR, aunque a continuación solamente se presentan los resultados obtenidos con la proteína, por ser de más interés en aplicaciones bioanalíticas como las presentadas en este trabajo.

El espectro IR del producto obtenido tras llevar a cabo la reacción con la albúmina muestra varios cambios en las bandas ([Figura 9.4](#)). Por un lado, aparecen bandas a un número de onda cercano a  $2950\text{ cm}^{-1}$ , que indica la presencia de grupos CH, una banda hacia  $1530\text{ cm}^{-1}$ , que indica la presencia de grupos C-C o C-N, y además, una banda hacia  $1400\text{ cm}^{-1}$ , que se asigna a grupos amonio (N-H). La banda de los grupos carboxilo de la albúmina estaría en una posición cercana a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , por lo que no se observa claramente por la presencia de una banda en esta posición debido al  $\text{H}_2\text{O}$  adsorbido en las nanopartículas. La presencia de estos grupos pone de manifiesto que existe una interacción electrostática entre la proteína y las nanopartículas. Las TiPNPs así funcionalizadas fueron puestas en una disolución con un exceso de ion  $\text{NH}_4^+$  para producir el intercambio entre este ion y el ion formado por la proteína. Es racional pensar que la unión del ion  $\text{NH}_4^+$ , por el menor tamaño y exceso de concentración, hacia las NPs fuera más favorable y podría desplazar a la proteína unida de manera electrostática. El espectro IR después de llevar a cabo este proceso muestra un aumento de la intensidad de la banda de  $1400\text{ cm}^{-1}$ , indicando la eficaz unión de los grupos amonio, pero sigue mostrando la banda a  $1530\text{ cm}^{-1}$ , revelando la presencia de la proteína incluso después del intercambio iónico. Este hecho pone de manifiesto que la unión proteica, además de electrostática se produce también mediante

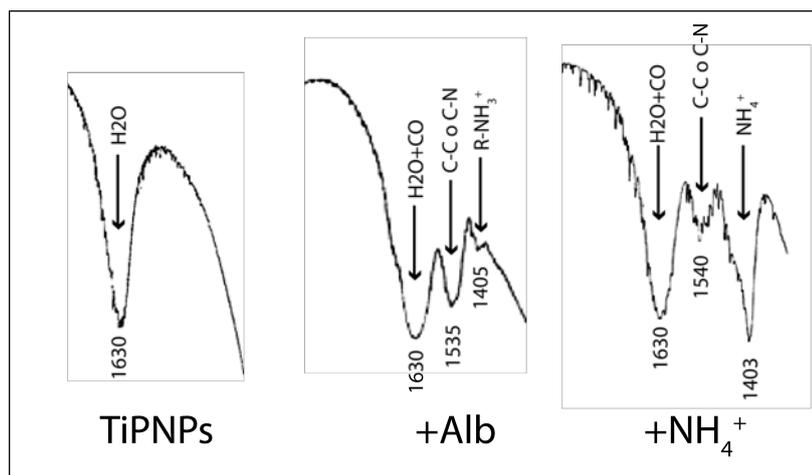


Figura 9.4: Espectro IR de CdTiPNPs sin modificar, modificadas con albúmina y modificadas con albúmina tras su intercambio con  $\text{NH}_4^+$ .

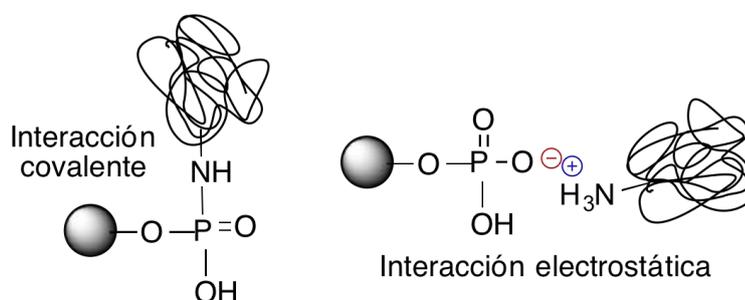


Figura 9.5: Posible interacción mixta entre electrostática y covalente de la proteína con las TiPNPs.

una interacción más fuerte, que podría ser covalente o mediante una gran cantidad de puentes de hidrógenos. Por otro lado, el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  muestra una disminución de las bandas atribuidas a  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$  y  $(\text{HPO}_4)^{2-}$ , hecho que sugiere que la proteína se une a las nanopartículas por ambos grupos, por lo que ya sea la unión covalente o la electrostática se realiza con estos grupos de la nanopartícula. En otro aspecto, medidas por EDX muestran que existe la misma relación Cd/Ti antes y después de la unión con la proteína, por lo que parece que, aunque se unan a grupos similares, la proteína no es capaz de desplazar el metal enlazado y por tanto, solamente se unirá a los grupos fosfato que queden libre en la nanopartícula. En resumen, estos estudios sugieren que la proteína se une a los grupos fosfatos de las nanopartículas mediante una mezcla de interacciones, electrostática y otra interacción más fuerte, que podría ser covalente, como se esquematiza en la [Figura 9.5](#). El valor obtenido para el potencial  $\zeta$  de las nanopartículas así obtenidas muestran un resultado similar al primer método de funcionalización:  $-35 \pm 1$  eV.

#### 9.4 BIOSENSOR PARA BIOTINA CON NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON CADMIO COMO MARCA

Con el objetivo de llevar a cabo la puesta a punto de un biosensor de afinidad para la determinación de biotina en un ensayo competitivo como el descrito en la [Figura 9.1](#) se optimizaron ciertos parámetros que se preveía que tuvieran un efecto en la señal analítica final: la concentración de albúmina biotinilada que se utiliza como elemento sensor, y la concentración del reactivo marcado (CdTiPNPs-NTV). Para la etapa de bloqueo se utilizó una disolución de BSA al 2% en PBS que se hizo reaccionar durante 30 minutos. Esta etapa no fue optimizada por el buen resultado obtenido para evitar adsorciones inespecíficas, hecho comprobado por las bajas señales voltamperométricas del blanco al potencial cercano a la redisolución de cadmio. El tiempo de reacción de las CdTiPNPs-NTV con el sensor fue también de 30 minutos, como en el caso de los QDs.

En primer lugar se evaluó el funcionamiento del biosensor utilizando  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  de Alb-BT, y la disolución de CdTiPNPs-NTV directamente obtenida del proceso de biofuncionalización. El voltamperograma obtenido se muestra en la [Figura 9.6](#), junto a la respuesta obtenida para una medida del blanco del biosensor (sin Alb-BT en la superficie electródica, pero con el resto de las etapas). Como se puede observar, la etapa de bloqueo es suficiente para que no se produzca la adsorción inespecífica de las CdTiPNPs-NTV, y no aparece ninguna señal para el blanco. A continuación, se llevó a cabo la optimización de la concentración de Alb-BT que se utiliza para la generación de la superficie sensora. Diferentes concentraciones de Alb-BT fueron añadidas en la superficie del transductor ( $0.01$ ,  $0.05$ ,  $0.1$ ,  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y se llevó a cabo el procedimiento del biosensor de afinidad en las mismas condiciones mencionadas. La señal analítica aumentó con concentraciones crecientes de Alb-BT hasta  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ , para la cual se obtiene la mayor señal. Utilizando  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  se obtiene una señal menor que para  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ , hecho que indica una menor eficacia de unión de la reacción de afinidad, probablemente debido a que con concentraciones mayores, aunque teóricamente un mayor número de sitios de unión están presentes, no están disponibles para la unión por impedimentos estéricos. Este es un problema que puede darse cuando se utilizan fases sensoras modificadas por adsorción física, por lo que la elección de la concentración del elemento de reconocimiento es un paso crítico. A continuación, utilizando  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$  para la Alb-BT se estudió el efecto de la concentración de CdTiPNPs-NTV ( $0$ ,  $5$ ,  $10$ ,  $20$ ,  $40$ ,  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  en PBS), cuyos resultados obtenidos se muestran en la [Figura 9.7](#). Se obtiene una señal creciente hasta

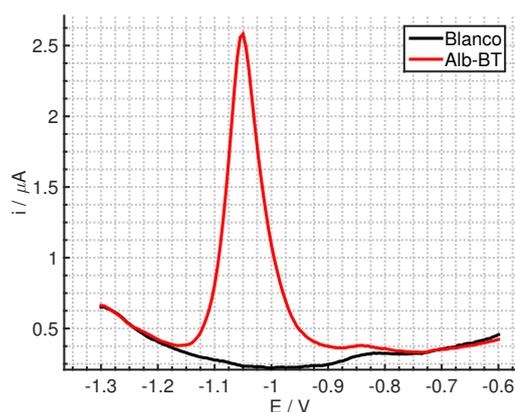


Figura 9.6: Respuesta SWV para el biosensor con CdTiPNPs-NTV como marca en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de Alb-BT (negra).

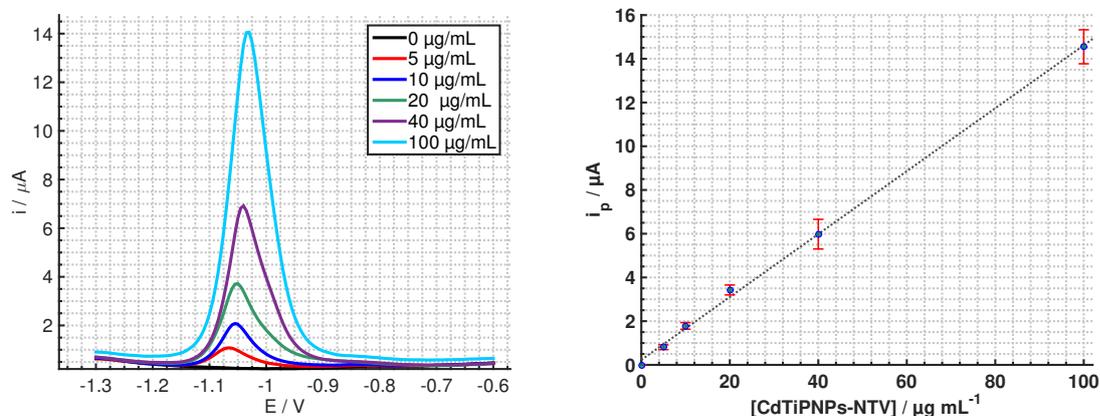


Figura 9.7: Respuesta SWV del biosensor de afinidad para diferentes concentraciones de CdTiPNPs-NTV y recta de calibrado asociada.

$100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (una dilución 1:10 desde el reactivo inicial) según la siguiente ecuación lineal:  $i_p (\mu\text{A}) = 0.14 [\text{CdTiPNPs-NTV}] + 0.23$ ,  $R^2 = 0.991$  ( $n=3$ ), con una RSD entre pendientes del 9.1 %. Analizando esta recta de calibrado, se elige utilizar una concentración de  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  para la disolución de CdTiPNPs-NTV en el ensayo competitivo posterior, ya que esta concentración proporciona una señal alta y se encuentra en una zona de máxima pendiente del calibrado, esperando que responda sensiblemente a cambios en la concentración de biotina en disolución.

A continuación, se llevó a cabo el biosensor competitivo (entre biotina y CdTiPNPs-NTV) esquematizado en la [Figura 9.1](#) utilizando concentraciones crecientes de biotina. La biotina libre puede unirse a la neutravidina marcada, evitando su reacción con la superficie sensora y por tanto, tras su lavado, se obtiene una respuesta decreciente con

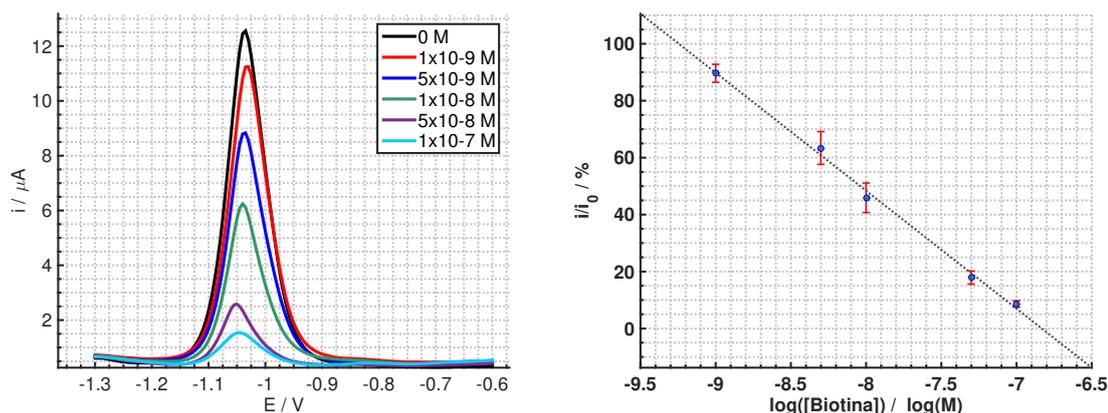


Figura 9.8: Respuesta SWV del biosensor competitivo para diferentes concentraciones de biotina y recta de calibrado logarítmica asociada.

concentraciones crecientes de biotina libre, obteniendo la máxima señal en ausencia de biotina. Una respuesta logarítmica es obtenida (como se observa en la [Figura 9.8](#)), de la misma manera que para el ensayo competitivo usando QDs como marca. Una dependencia lineal entre  $i/i_0$  (%) y el logaritmo de la concentración de biotina fue obtenida desde  $1 \times 10^{-9}$  hasta  $1 \times 10^{-7}$  M, donde  $i_0$  es la corriente obtenida en ausencia de biotina e  $i$  es la corriente cuando la biotina libre está presente en disolución. Según el método que se indica en la introducción para este tipo de curvas (rango dinámico para la respuesta entre un 20 y 80% del máximo), se define que el rango dinámico está entre  $2 \times 10^{-9}$  M y  $4 \times 10^{-8}$  M, con un límite de detección estimado de  $1 \times 10^{-9}$  M de biotina (señal para una disminución del 10% de la máxima respuesta) y se calculó una RSD de 7.1% ( $n = 3$ ) para la pendiente de diferentes rectas de calibrado, indicando una buena reproducibilidad en la metodología. Con este método se obtienen características analíticas muy similares al ensayo realizado con QDs, que como se comentó en el capítulo específico presenta un buen rendimiento en comparación a otros trabajos publicados con detección electroquímica para la determinación de biotina. La igualdad analítica en los biosensores desarrollados en este trabajo para la determinación de biotina es una posible consecuencia de un LOD muy similar que se encuentra en los dos tipos de nanopartículas (CdTiPNPs vs. QDs), como se estimó en el capítulo anterior. Es probable que la introducción de una mayor cantidad de metal en las CdTiPNPs utilizando otro tipo de aniones podría mejorar las características de este tipo de biosensores en comparación a los QDs, ya que se podría detectar un menor número de estas nanopartículas.

9.5 BIOSENSOR MULTIANALITO UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON COBRE Y MERCURIO

Tras la biofuncionalización de las HgTiPNPs y CuTiPNPs con el nuevo método desarrollado y descrito en un apartado anterior, se comprobó su funcionamiento en un biosensor de afinidad como el anterior con la superficie sensora modificada con Alb-BT y usando las MTiPNPs-NTV de forma individual. La obtención de las señales características de ambos metales y con una clara diferenciación de la señal del blanco, muestran que la reacción de afinidad se produce y que el método de funcionalización mantiene la función biológica de la neutravidina. Por tanto, se pasó a desarrollar el biosensor multianalito para la detección simultánea de anticuerpos IgA e IgG anti-transglutaminasa. Las primeras etapas de la metodología del biosensor son similares a las descritas en el [Capítulo 6](#), por lo que, la concentración de tTG utilizada fue la misma que se optimizó anteriormente ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Además, utilizando el procedimiento de modificación hidrofílica de la superficie, se decidió evitar la etapa de bloqueo adicional. Durante estas optimizaciones, la disolución de suero utilizada fue una mezcla de los controles positivos y negativos del kit en relación 1:1:0.2 con PBS de para ambos analitos. El tiempo de reacción para esta etapa fue también de 60 minutos, como para el caso de los QDs. Sin duda la etapa de la optimización más compleja para el desarrollo del biosensor multianalito fue la reacción entre las nanopartículas marcadas con neutravidina y el anticuerpo biotinilado, que se llevó a cabo en un microtubo de *low-binding*. Se eligió un tiempo de reacción constante de 50 minutos, para hacerse de forma simultánea a la etapa previa del inmunosensor y se estudió el efecto de concentraciones variables de los anticuerpos biotinilados ( $0.5, 1, 2, 5, 7.5$  y  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en la señal final obtenida en el biosensor, manteniendo constante la concentración de MTiPNPs-NTV ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como se puede observar en la [Figura 9.9](#), la mejor señal para el control positivo se obtuvo para una concentración de  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de ambos anticuerpos biotinilados (anti-H-IgA-BT, anti-H-IgG-BT). A partir de esa concentración, parece existir un efecto negativo en la señal, probablemente debido a que parte del anticuerpo no está unido a las nanopartículas (está en exceso) y reacciona con la superficie sensora disminuyendo la señal. Cabe destacar que se decidió funcionalizar estas nanopartículas con NTV, por el coste más bajo de esta proteína y la versatilidad a unirse a diferentes biomoléculas biotiniladas, en comparación a realizar la funcionalización directa al anticuerpo deseado. Aunque si se hiciera la funcionalización directa con el anticuerpo, el procedimiento podría ser más sencillo, evitando la reacción BT-NTV externa

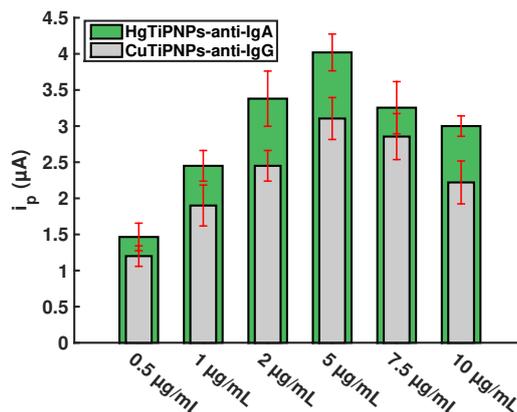


Figura 9.9: Efecto de la concentración de anticuerpo (IgA-BT, IgG-BT) en la reacción de afinidad con MTiPNPs-NTV en la corriente de pico del biosensor.

(aunque por la alta afinidad de esta reacción y llevarse a cabo en disolución con agitación, se esperaba una reacción eficiente). Por otro lado, la razón de unir las HgTiPNPs al anticuerpo anti-IgA fue por la mayor sensibilidad obtenida en la detección de las HgTiPNPs en comparación a las CuTiPNPs, como se describió en el capítulo anterior. El biomarcador anti-tTG-IgA es más eficaz que el anti-tTG-IgG para el diagnóstico de la enfermedad, por lo que la detección de concentraciones menores de anti-tTG-IgA es de mayor importancia que la detección de anticuerpos anti-tTG-IgG (biomarcador que se suele determinar cuando la persona tiene deficiencia de IgA). La última etapa del biosensor fue llevada a cabo, utilizando una disolución (mezcla 1:1) de los reactivos marcados obtenidos en la reacción externa anterior (HgTiPNPs-NTV-BT-anti-H-IgA y CuTiPNPs-NTV-BT-anti-H-IgG). La reacción inmunológica de los anticuerpos marcados con el sensor se llevó a cabo durante 60 minutos.

Por otro lado, el efecto de realizar esta última reacción a una temperatura superior a la temperatura ambiente fue evaluado. En algunos casos, ya se ha reportado que una mayor temperatura puede mejorar la eficacia de la reacción biológica usando MTiPNPs<sup>191,280</sup>. Este hecho puede deberse a que estas nanopartículas tienen una solubilidad relativamente baja, y por tanto, una temperatura superior mejoraría la movilidad de los reactivos aumentando la eficacia de la unión. En la [Figura 9.10](#) se muestra la respuesta voltamperométrica obtenida para el biosensor a 23 °C (temperatura ambiente) y a 35 °C mostrando una mayor respuesta para una temperatura más alta.

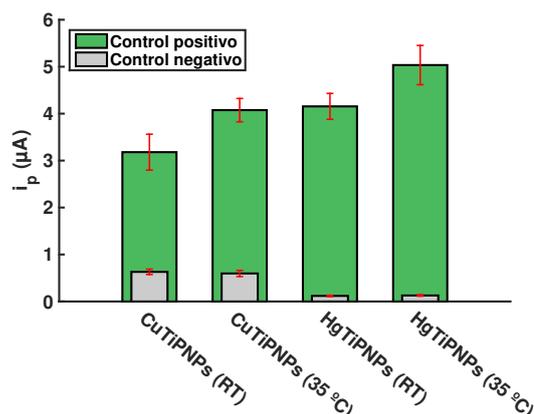


Figura 9.10: Efecto de la temperatura de reacción de la etapa con el anticuerpo marcado en las corrientes de los picos voltamperométricos para un control positivo y negativo.

### 9.5.1 Comportamiento analítico del biosensor multidetección

Con las condiciones optimizadas, se llevó a cabo la evaluación analítica de la respuesta del sensor con concentraciones crecientes de los analitos. Para ello se utilizaron los calibradores de suero humano de dos kits ELISA comerciales (uno para la detección de anti-tTG-IgA y otro para la detección de anti-tTG-IgG). Los calibradores fueron mezclados con la misma relación utilizada en la optimización (1:1:0.2 para IgA:IgG:PBS), obteniendo disoluciones con las siguientes concentraciones de los analitos: 0, 1.4, 3.2, 7.3, 18.2 y 45.5 U mL<sup>-1</sup>. La Figura 9.11 muestra las rectas de calibrado y la respuesta voltamperométrica simultánea para las concentraciones evaluadas de los analitos. La concentración de 1.4 U mL<sup>-1</sup> no pudo ser diferenciada de la señal del blanco para ninguno de los dos analitos, indicando que esta concentración se encuentra por debajo del límite de detección del método. El rango dinámico para ambos analitos fue similar: desde 3.2 hasta 45.5 U mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, las ecuaciones de regresión lineal fueron diferentes, lo que indica una diferente sensibilidad frente a la detección de cada biomarcador. La ecuación para el calibrado de anti-tTG-IgG fue la siguiente:  $i_p (\mu A) = 0.21 [\text{anti-tTG IgG}] (U \text{ mL}^{-1}) + 0.84$  ( $R^2 = 0.998$ ), mientras que para el calibrado de anti-tTG-IgA fue de  $i_p (\mu A) = 0.31 [\text{anti-tTG IgA}] (U \text{ mL}^{-1}) + 0.59$  ( $R^2 = 0.999$ ). La reproducibilidad de las pendientes de las rectas de calibrado ( $n=3$ ) fueron de 10.3 % y 8.8 %, respectivamente. Los límites de detección calculados desde la recta de calibrado fueron de 2.2 U mL<sup>-1</sup> para anti-tTG IgA y de 1.8 U mL<sup>-1</sup> para anti-tTG IgG, respectivamente. Las características analíticas obtenidas son aceptables para la determinación de este tipo de biomarcadores, ya que pueden detectar y diferenciar con-

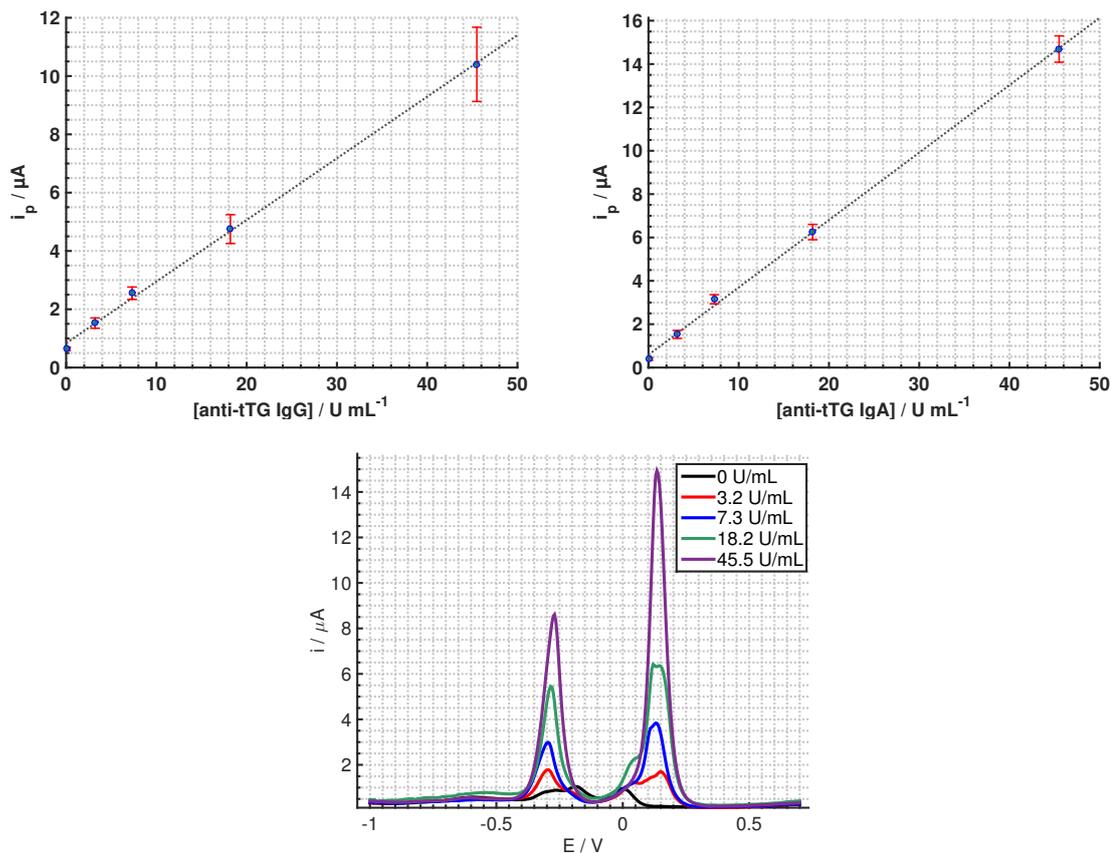


Figura 9.11: Respuesta SWV obtenida para diferentes concentraciones de los biomarcadores y rectas de calibrado asociadas.

centraciones de interés clínico (enumeradas en el [Capítulo 6](#)), además de tener la ventaja de llevar a cabo el ensayo de manera simultánea con la detección multianalito en la misma muestra.

#### 9.5.2 Evaluación de la reactividad cruzada

Para evaluar la reactividad cruzada de los reactivos utilizados en el biosensor multianalito, se llevó a cabo el biosensor con los parámetros optimizados, pero variando el número de analitos: 1) controles negativos para ambos analitos, 2) control positivo para anti-tTG-IgG y negativo para anti-tTG-IgA, 3) control positivo para anti-tTG-IgA y negativo para anti-tTG-IgG, y 4) controles positivos para ambos analitos. La respuesta voltamperométrica obtenida para todos los casos se ilustra en la [Figura 9.12](#). En ausencia de los analitos (utilizando los controles negativos de los kits ELISA), se observó una pequeña señal vol-

tamperométrica (menor de  $1 \mu\text{A}$ ) probablemente debida a impurezas de la superficie electroquímica (confirmado al realizar la medida de la disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.1 \text{ M}$  en un electrodo sin modificar), pero que puso de manifiesto que no ocurre una adsorción inespecífica muy significativa (quizás un poco más para el reactivo de las CuTiPNPs). La señal obtenida cuando se realiza la reacción con uno solo de los analitos o con ambos fue similar para una concentración de analito de  $18.2 \text{ U mL}^{-1}$ . Según el diseño de este sensor, los dos analitos compiten por los sitios de unión de la superficie, por lo que con una cantidad elevada de alguno de ellos (o de ambos) que saturaran toda la superficie disponible podría ocurrir una unión no cuantitativa de alguno de ellos en la detección simultánea. Con estos experimentos, se obtienen corrientes de pico similares para los experimentos realizados con uno o los dos analitos a estas concentraciones, indicando que la superficie sensora no está saturada y la unión de ambos analitos es cuantitativa, pero se debe indicar que a concentraciones mayores de  $90 \text{ U mL}^{-1}$  (considerando la mezcla de ambos analitos), este sensor podría sufrir este problema, debido a su diseño, tras la saturación de toda la superficie sensora. Sin embargo, la detección de concentraciones tan altas de estos biomarcadores no dejaría prácticamente dudas del diagnóstico de la enfermedad. Un diseño más eficaz para evitar este problema podría conseguirse tras modificar la superficie sensora con dos elementos de reconocimiento diferentes que se unieran a dos diferentes biomarcadores, de esa manera se evita la competición por los mismos sitios de unión y la saturación de la superficie sensora por parte de un analito, no afectaría a la detección del otro analito. Por tanto, el autor es consciente de que el diseño de este biosensor puede ser mejorado. Sin embargo, el objetivo de este trabajo era el desarrollo de un biosensor desechable con detección multianalito usando MTiPNPs, biosensor que ha sido posible de fabricar y evaluar su correcto comportamiento analítico.

## 9.6 CONCLUSIONES

En este capítulo se evalúa la posibilidad de utilizar MTiPNPs como marca de biosensores electroquímicos desechables, además de que se propone un método sencillo para biofuncionalizar MTiPNPs con proteínas. Los resultados de la caracterización sugieren que la proteína se une a las nanopartículas de dos formas diferentes: mediante un enlace fuerte a los grupos fosfato (posiblemente covalente), y mediante interacción electrostática. De este modo se obtiene una metodología más simple y con menores etapas de reacción/purificación que la metodología descrita para este tipo de nanopartículas. Un biosensor para

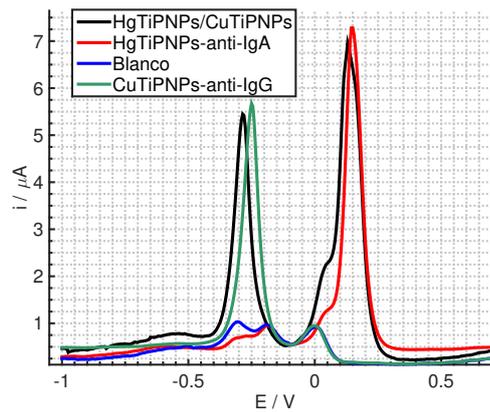
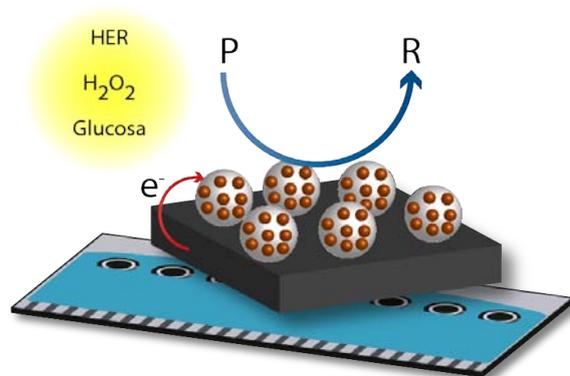


Figura 9.12: Respuesta SWV para una mezcla de biomarcadores (negro), en ausencia de anti-tTG IgA (verde), en ausencia de anti-tTG IgG (rojo) y en ausencia de ambos analitos (azul).

la determinación de biotina se desarrolla utilizando CdTiPNPs como marca de detección y tarjetas serigrafiadas de 8 canales como transductor. El biosensor competitivo muestra unos resultados muy competentes siendo capaz de determinar biotina en concentraciones del orden de nM, con características analíticas muy similares al método utilizando quantum dots previamente descrito. La utilización de MTiPNPs como marca de detección permite obtener unos resultados analíticos similares a la utilización de QDs pero evitando la etapa de digestión ácida y por tanto, simplificando el procedimiento. Finalmente, se utilizan MTiPNPs modificadas con Hg y Cu para llevar a cabo un biosensor multianalito para la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. Este sensor muestra excelentes resultados, mejorando la sensibilidad (teniendo en cuenta la pendiente de los calibrados) del método desarrollado con QDs, y permitiendo la detección simultánea. La gran cantidad de metales como Hg y Cu que pueden aceptar las nanopartículas de fosfato de titanio permiten la detección sensible de biomarcadores de una manera sencilla y rápida.

# APLICACIONES ELECTROCATALÍTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO

---



## 10.1 INTRODUCCIÓN

Los fosfatos de titanio, y especialmente, en su forma de nanopartículas, han sido empleados como catalizador de reacciones orgánicas. Sin embargo, debido a su carácter semiconductor su utilización como material electrodo no ha sido ampliamente utilizado. La introducción de metales en su estructura podría conferirle mejores propiedades de transferencia electrónica o cierta capacidad de catalizar reacciones electroquímicas. Por tanto, el objetivo de este capítulo fue evaluar posibles reacciones electrocatalizadas por las TiPNPs modificadas con metales.

La primera estrategia utilizada fue la de catalizar alguna reacción electroquímica de reducción llevando a cabo la reducción simultánea de las MTiPNPs. Se eligieron las Ag-TiPNPs debido a la gran capacidad de la plata de catalizar diferentes reacciones electroquímicas. Entre las reacciones que la plata puede catalizar se encuentra la HER, y se evaluó la capacidad de las AgTiPNPs de catalizar la HER en un medio ácido. Tras la optimiza-

ción de la metodología y condiciones experimentales, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de AgTiPNPs con el método electrocatalítico y se comparó con el método voltamperométrico descrito en el [Capítulo 8](#). De esta forma, se pudo valorar la posibilidad de utilizar el método electrocatalítico en lugar de uno voltamperométrico como detección en biosensores electroquímicos, ya que la HER catalizada por otras nanopartículas ha sido una reacción empleada con este fin obteniendo buenos resultados. A continuación, se utilizaron estas mismas nanopartículas (AgTiPNPs) para evaluar la electrocatálisis de la reducción de  $H_2O_2$ , y se desarrolló un biosensor enzimático para la determinación de glucosa utilizando GOx como enzima y la detección directa catalizada del  $H_2O_2$  generado en la reacción enzimática, sin utilizar un mediador electroquímico.

Como segunda estrategia, se estudió la electrocatálisis directa de las CuTiPNPs hacia la oxidación de glucosa. Como se mencionó en la introducción, los óxidos de Cu(II) en un medio básico son capaces de catalizar la oxidación de la glucosa tras su electro-oxidación a Cu(III), especie altamente reactiva, y diversos trabajos donde se lleva a cabo la determinación no enzimática de glucosa con electrodos de especies de cobre han sido descritos. Las especies de Cu(III) han podido ser generadas solamente en ciertas condiciones donde se encuentren fuertemente estabilizadas. Según reflejó Baldwin et al.<sup>282</sup>, aunque los electrodos de cobre descritos son diferentes en naturaleza, la oxidación de carbohidratos solamente ocurre en un medio alcalino, y la superficie electródica en esos casos se encuentra básicamente en forma de óxido o hidróxido, y el mecanismo seguido en los casos descritos es similar, aunque bien es cierto, que el mecanismo de reacción no es bien conocido por la dificultad de caracterizar las especies de Cu(III), altamente reactivas.

## 10.2 ELECTROCATÁLISIS DE LA REACCIÓN DE EVOLUCIÓN DE HIDRÓGENO USANDO NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON PLATA

Para observar si existía algún efecto electrocatalítico sobre la HER usando AgTiPNPs, se registraron medidas por CV para SPCEs modificados con TiPNPs, AgTiPNPs y sin modificar ([Figura 10.1](#)) barriendo desde un potencial de +0.4 V hasta -1.4 V en una disolución de HCl 1 M. Se puede observar una clara diferencia en las curvas de reducción para los electrodos sin modificar y los modificados con AgTiPNPs. Tanto la corriente catódica obtenida en la reducción de protones como el potencial al que comienza esta reacción aumentaron con la cantidad de AgTiPNPs adsorbidas sobre el electrodo, hecho que sugiere un incremento en la velocidad de reacción de la HER. Este hecho muestra un claro

efecto electrocatalítico de AgTiPNPs hacia la HER en una disolución ácida. En el voltamperograma obtenido para los electrodos modificados con TiPNPs no se observa este efecto electrocatalítico. Por tanto, se deduce que el efecto electrocatalítico es producido por la plata que está enlazada a la estructura de las TiPNPs. Tras aplicar el potencial de reducción en el barrido directo para generar la HER, iones Ag(I) son reducidos y Ag elemental se genera sobre la superficie electródica (con forma de nanopartículas como se pudo observar en imágenes SEM obtenidas después de llevar a cabo la reducción). Un posible mecanismo de este proceso se ilustra en la (Figura 10.2). Las imágenes SEM de electrodos modificados con AgTiPNPs antes y después de la reducción se muestran en la Figura 10.3. Para electrodos modificados antes de la reducción, la plata se puede observar con un color más brillante dentro de las capas intermedias de la modificación electródica de las TiPNPs. Es difícil saber si estas nanopartículas de plata son reducidas por medio del haz electrónico de excitación del instrumento o ya han sido espontáneamente generadas en el producto sólido almacenado, ya que como se describió en anteriormente, se observa un cambio de color en las AgTiPNPs con el paso del tiempo desde su síntesis. Las imágenes de TEM obtenidas, también muestran una fase más oscura que indica la presencia de nanopartículas de plata enlazadas sobre la estructura de las TiPNPs, formando un material nanohíbrido (Figura 10.4). De la misma forma, es difícil saber si todas estas AgNPs son generadas en el momento de hacer la medida o ya se encontraban presentes. Sin embargo, tras llevar a cabo la reducción de las AgTiPNPs sobre el electrodo, la mayor parte de la plata observada entre capas desaparece y nuevas AgNPs son generadas sobre la superficie de las AgTiPNPs que se encuentran recubriendo el electrodo (ver la Figura 10.3). Este hecho parece indicar que tras la adición del medio ácido (HCl 1 M), las AgNPs que se podían observar entre capas son digeridas por un ataque ácido, mientras que la Ag que se pudiera encontrar en forma iónica enlazada a las TiPNPs es posiblemente extraída, ya que, como se describió en el Capítulo 8, la adición de un medio ácido es un método muy efectivo para extraer los iones de las MTiPNPs. Esto permite generar nuevas AgNPs sobre la superficie electródica que son capaces de catalizar la reducción de la HER a un potencial adecuado. Por otro lado, parece que se mantienen AgNPs entre las capas de las TiPNPs, como se puede observar por puntos claros en algunas zonas. Este hecho, además de la estructura porosa de las TiPNPs puede causar que la reacción catalítica se produzca no sólo en la superficie sino también entre los poros de las capas de las TiPNPs. Por tanto, todo parece indicar que el efecto electrocatalítico observado para la HER es debido a estas AgNPs formadas (o ya presentes) sobre el electrodo. Estos resultados son coherentes

con otros estudios que han mostrado este efecto catalítico de la plata hacia la HER<sup>283</sup>. Es interesante destacar que incluso con una película relativamente homogénea como la que se observa en estos casos, es posible la transferencia electrónica entre el electrodo y especies por encima del recubrimiento semiconductor, como se pone de manifiesto por las AgNPs generadas en la superficie. Para comprender en mayor medida la transferencia electrónica en la superficie de los electrodos modificados, se hizo un estudio de EIS para electrodos modificados con TiPNPs, con AgTiPNPs y con AgTiPNPs reducidas y se compararon los resultados a un electrodo sin modificar. Como se puede observar visualmente en la [Figura 10.5](#), que representa la gráfica de Nyquist, la presencia de TiPNPs aumenta significativamente la  $R_{ct}$  en comparación a los SPCEs sin modificar, mientras que si el electrodo se modifica con AgTiPNPs, se obtiene una respuesta impedimétrica similar a los SPCEs. Este hecho puede deberse a que la presencia de AgNPs unidas a las AgTiPNPs mejoran la transferencia electrónica, minimizando el efecto inhibitorio de las TiPNPs sobre la superficie electródica. En los resultados para las CuTiPNPs descritos en el [Capítulo 8](#), se obtuvo una respuesta impedimétrica similar a la que se obtiene con las TiPNPs, algo que parece sugerir que en este caso, la influencia de las AgNPs es indispensable. Un aumento en la cantidad de AgNPs, conseguida mediante la reducción de las AgTiPNPs, resulta en una disminución de la  $R_{ct}$  que parece constatar la influencia de las AgNPs en el proceso de transferencia electrónica.

Este efecto electrocatalítico puede medirse también por cronoamperometría aplicando un potencial suficiente para llevar a cabo la HER en presencia de AgTiPNPs. Con el objetivo de optimizar la medida cronoamperométrica, varios parámetros que pueden afectar a la señal como el potencial de reducción aplicado ([Figura 10.6](#)) y el tipo y concentración de ácido fueron evaluados. Previamente, los electrodos fueron modificados con  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgTiPNPs y se comparó con la señal obtenida para electrodos sin modificar. Los mejores resultados en términos de la relación señal/blanco fueron obtenidos con HCl 1 M y, por tanto, fue elegido como el medio ácido más adecuado (aunque se obtiene una mejor relación con el  $\text{HNO}_3$ , por la mayor irreproducibilidad se descarta usar este medio). El potencial de reducción óptimo fue  $-1.2 \text{ V}$ .

Tras la optimización, se llevaron a cabo una serie de experimentos para obtener una curva de calibración con concentraciones crecientes de AgTiPNPs ( $0.001$ ,  $0.01$ ,  $0.1$ ,  $2$  y  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). La señal analítica considerada fue la corriente catódica generada a un tiempo de  $150 \text{ s}$  ([Figura 10.7a](#)), ya que a este tiempo la corriente se encuentra ciertamente estabilizada. Interesantemente, la forma de las curvas cronoamperométricas no parecen

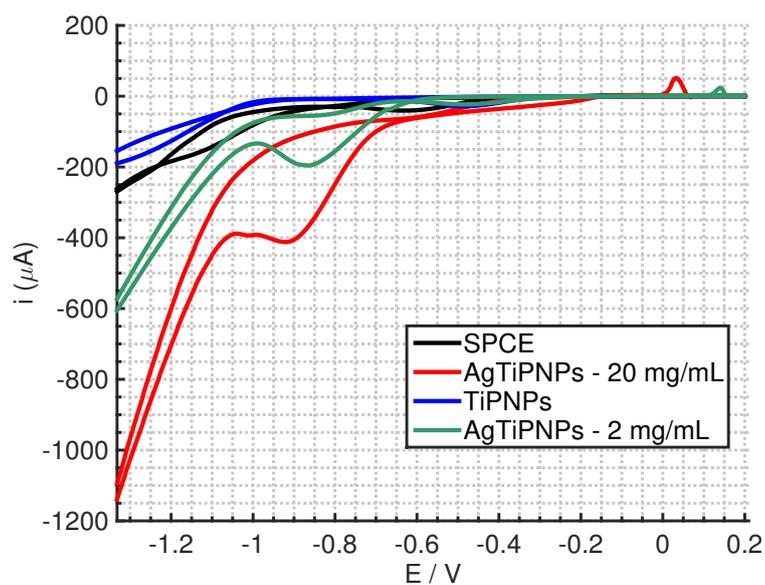


Figura 10.1: Voltamperometría cíclica para diferentes cantidades de AgTiPNPs (0, 2 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) y 200 mg mL<sup>-1</sup> de TiPNPs en HCl 1 M.

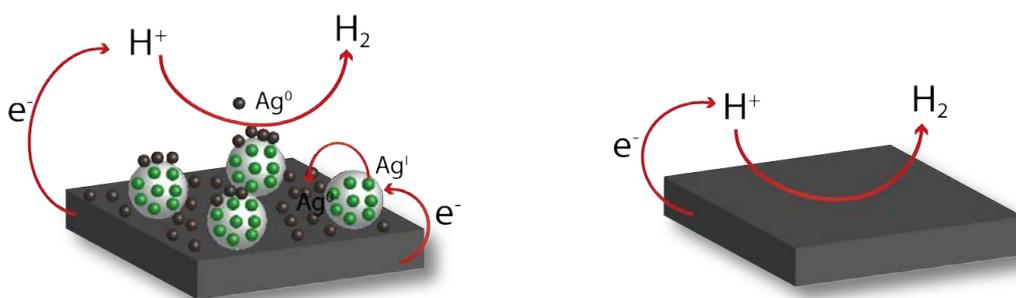


Figura 10.2: Esquema de la HER catalizada por AgTiPNPs y sin catalizar.

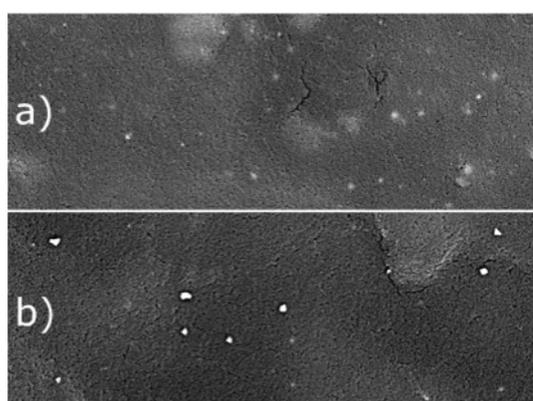


Figura 10.3: Imágenes de SEM de un electrodo serigrafiado modificado con AgTiPNPs (a) y modificado con AgTiPNPs tras su reducción (b).

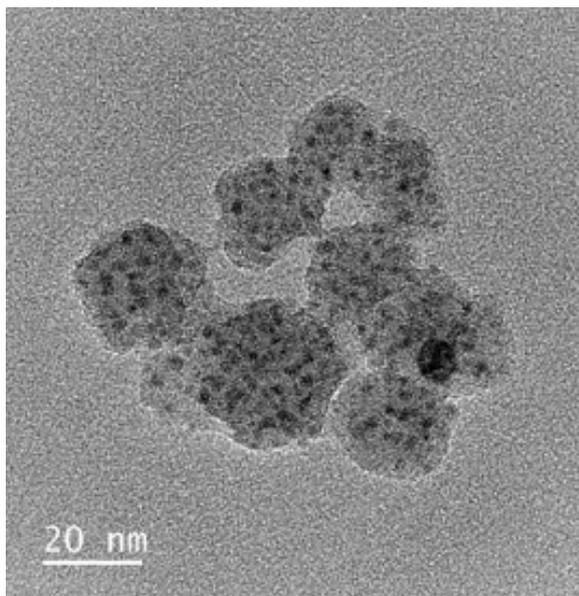


Figura 10.4: Imagen de TEM de las AgTiPNPs.

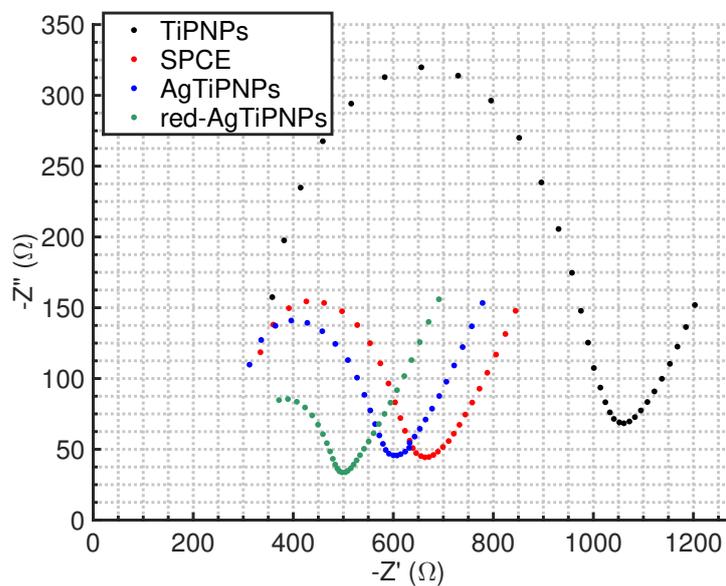


Figura 10.5: Gráfica de Nyquist para SPCEs sin modificar (rojo), modificados con TiPNPs (negro), modificados con AgTiPNPs (azul) y modificados con AgTiPNPs reducidas (verde).

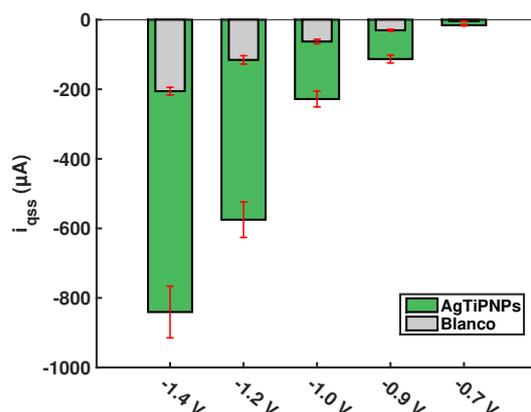


Figura 10.6: Corrientes cronoamperométricas obtenidas a diferentes potenciales de reducción en presencia y ausencia (blanco) de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgTiPNPs en HCl 0.1.

comportarse siguiendo la ecuación de Cottrell totalmente, sino que parecen sufrir el efecto de otros componentes, como la nucleación de partículas metálicas (representada por un máximo local a los pocos segundos de iniciar la medida). Sin embargo, esta nucleación tampoco se observa claramente (por ejemplo, en comparación a los resultados descritos para Ag@QDs), hecho que indica que otros procesos están influenciando la señal cronoamperométrica. La señal analítica se relacionó con el logaritmo de la cantidad de AgTiPNPs (Figura 10.7b), dando lugar a una relación lineal en el rango entre  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de AgTiPNPs de acuerdo a la siguiente ecuación:  $i (\mu\text{A}) = -191.3 + 166.7 \log (\mu\text{g mL}^{-1} \text{ de AgTiPNPs})$ ,  $R^2 = 0.993$ ,  $n = 3$ . Se obtuvo un límite de detección de  $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgTiPNPs y una reproducibilidad del 8.9 % ( $n = 3$ ). El límite de detección se calculó como la cantidad de AgTiPNPs que da una señal analítica obtenida tras la adición a la señal del blanco de tres veces su desviación estándar.

En comparación con el método voltamperométrico, en general, se obtienen características analíticas similares. Aunque un LOD más bajo fue calculado con el método voltamperométrico, el menor valor detectado del rango lineal es comparable ( $0.5$  vs.  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgTiPNPs). Sin embargo, el método voltamperométrico tiene la ventaja de poder usar un tiempo de deposición más alto que mejoraría el LOD y la sensibilidad. Comparando el tiempo de análisis, tiempos similares fueron necesarios para hacer la determinación por ambos métodos. Por otro lado, el bajo pH del medio electrolítico para el método electrocatalítico (HCl 1 M) podría ser útil en ciertas aplicaciones donde se necesite un pH más bajo, y podría ser interesante para destruir material proteico de la superficie electrocatalítica en el momento de hacer la medida tras un bioensayo con el objetivo de mejorar el área

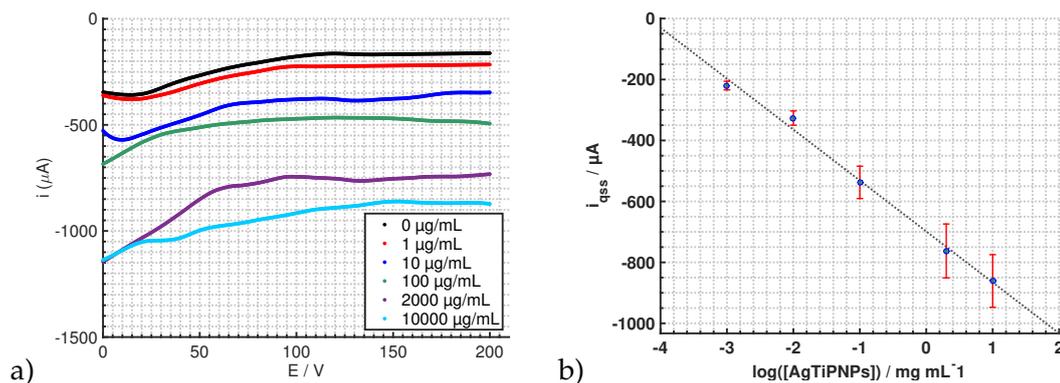


Figura 10.7: a) Curvas cronoamperométricas para 0.001, 0.01, 0.1, 2 y 10 mg mL<sup>-1</sup> de AgTiPNPs en HCl 1 M tras la aplicación de un potencial constante de -1.2 V. b) Recta de calibrado representando la señal analítica frente al logaritmo de la cantidad (en µg mL<sup>-1</sup>) de AgTiPNPs para las medidas cronoamperométricas a 150 s.

electroactiva. Sin embargo, aunque estas metodologías presentan características analíticas interesantes para la detección, la menor estabilidad de las AgTiPNPs frente a otras MTiPNPs fue determinante para no usarlas como marca de detección en biosensores.

### 10.3 ELECTROCATÁLISIS DE LA REDUCCIÓN DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> USANDO NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON PLATA Y SU APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Usando una estrategia similar a la descrita en el apartado anterior, se evaluó la capacidad de las AgTiPNPs de electrocatalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otra reacción electroquímica de interés, tanto en aplicaciones de energía, como en sensores. Para evaluar este efecto electrocatalítico, se registraron los voltamperogramas cíclicos de una disolución en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en SPCEs modificados y sin modificar. Una disolución reguladora de PBS 0.1 M pH 7 fue empleada para hacer estas medidas. En la [Figura 10.8](#) se muestran los voltamperogramas para todos los casos evaluados, con resultados muy interesantes. Para SPCEs sin modificar con AgTiPNPs y en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observa un proceso catódico con un potencial de pico alrededor de -0.85 V, que se atribuye a la ORR, ya que las medidas se llevan a cabo en presencia de O<sub>2</sub>. Cuando se realiza la misma medida en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observa un pequeño aumento en la corriente de este proceso, algo que parece indicar, que ambos procesos son similares o aparecen a un potencial muy cercano, algo coherente con el mecanismo predominante en la actualidad para la ORR,

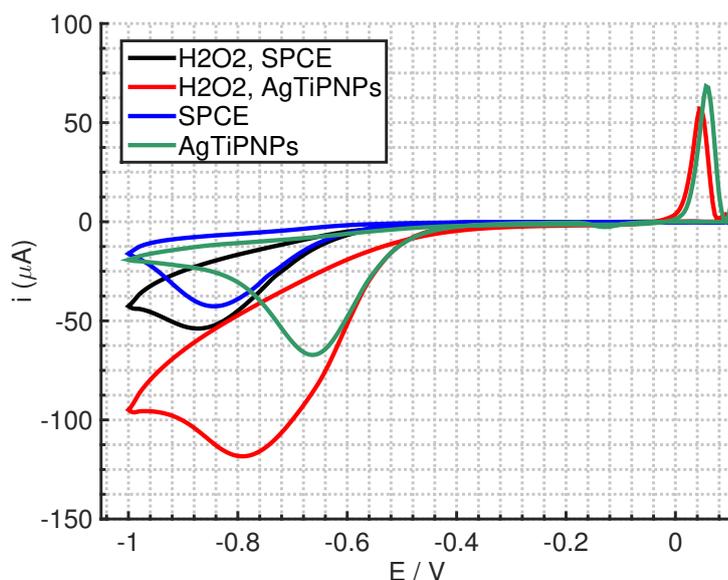


Figura 10.8: CVs para electrodos modificados con AgTiPNPs y sin modificar, en presencia y ausencia de 50 mM de  $H_2O_2$ .

que según se explicó en la introducción, involucra la adsorción de  $H_2O_2$  en la superficie electroquímica como intermedio de reacción. Sin embargo, parece que la primera etapa de la reducción de  $O_2$  a  $H_2O_2$  aparece a un potencial muy cercano y ambos procesos ( $O_2$  a  $H_2O_2$  y  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ) no se resuelven. Cuando se utilizan SPCEs modificados con AgTiPNPs y se lleva a cabo el registro de las CVs en las mismas condiciones dos aspectos son destacables, en ausencia de  $H_2O_2$ , la ORR se desplaza a un potencial más positivo debido a que es catalizada por las AgTiPNPs (y las AgNPs generadas in situ en este proceso). Cuando se realiza la medida en presencia de  $H_2O_2$ , se observa una curva con una corriente significativamente mayor, y dos procesos, aunque no muy bien resueltos, pueden observarse: un primer proceso a un potencial hacia -0.65 V y coincidente con la ORR en ausencia de  $H_2O_2$ , y un mayor proceso a un potencial sobre -0.78 V, que podría ser atribuido a la reducción catalizada del  $H_2O_2$  en presencia de AgTiPNPs. Aunque no se observan procesos característicos de la reducción de  $Ag^+$  a  $Ag^0$ , la presencia de un pico de redisolución a 0.05 V confirma la presencia de  $Ag^0$  en la superficie electroquímica, y es probablemente, la especie responsable de la catálisis de la reducción de  $H_2O_2$ , como ya ha sido descrito por otros autores<sup>106,105</sup>. Un mecanismo general de este proceso se ilustra en la [Figura 10.9](#)

Tras demostrar el efecto catalítico mediante técnicas voltamperométricas, se llevó a cabo la optimización de los parámetros para obtener una detección sensible de  $H_2O_2$  utilizan-

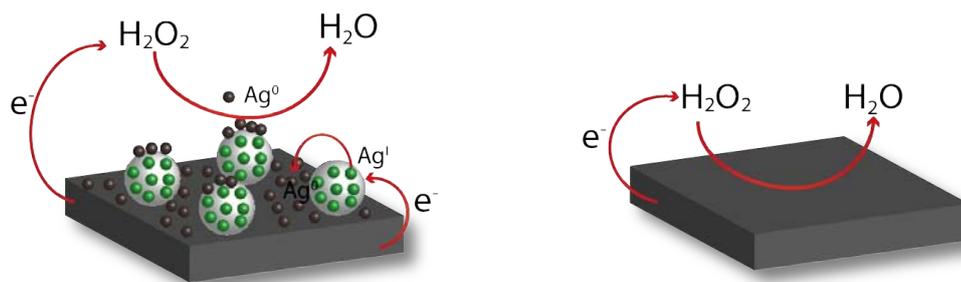


Figura 10.9: Esquema de la reacción catalítica de reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en electrodos modificados con AgTiPNPs y sin modificar.

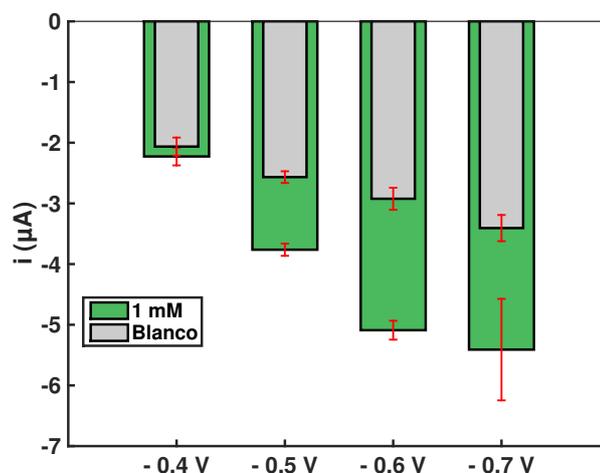


Figura 10.10: Efecto del potencial de detección en la respuesta cronoamperométrica de la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizando electrodos modificados con AgTiPNPs.

do la reacción catalizada en presencia de AgTiPNPs. Parámetros como la concentración de AgTiPNPs utilizada para modificar la superficie electródica como la disolución reguladora utilizada para la medida o el potencial aplicado para llevar a cabo la reducción fueron optimizados. La [Figura 10.10](#) ilustra el efecto del potencial de detección en la señal analítica obtenida para una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1 mM. Las condiciones más óptimas fueron para  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de AgTiPNPs, una disolución reguladora de PBS 0.1 M pH 7, y un potencial de detección de -0.5 V. Como se puede observar, una señal significativa fue obtenida en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hecho que puede ser debido a la ORR que se produce a un potencial cercano, y que no es posible de discriminar en estas condiciones (sin hacer las medidas tras eliminar el  $\text{O}_2$  de la disolución).

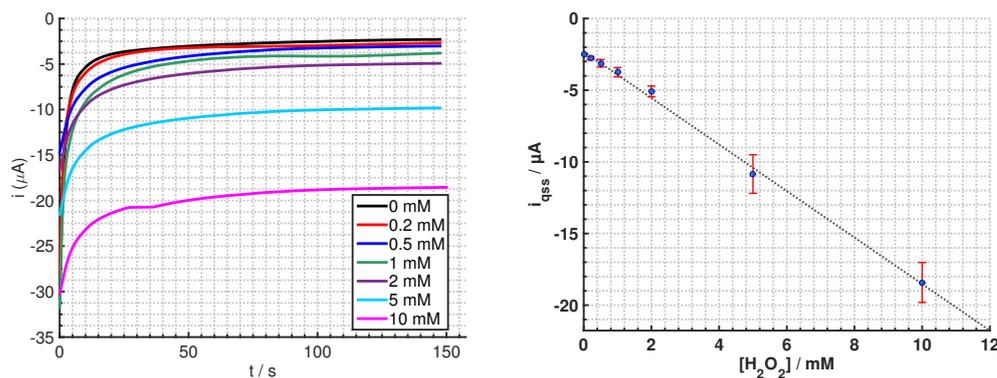


Figura 10.11: Respuesta cronoamperométrica para diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y recta de calibrado asociada.

Con las condiciones optimizadas, se llevó a cabo el registro de concentraciones crecientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con diferentes detectores nanoestructurados con AgTiPNPs. La Figura 10.11 muestra el calibrado en el rango dinámico que se obtiene para concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  desde 200  $\mu\text{M}$  a 10 mM según la ecuación lineal:  $i$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $1.52 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] - 2.3$  ( $R^2 = 0.998$ ) ( $n=3$ ). El límite de detección calculado fue de 85  $\mu\text{M}$ .

A continuación, el detector electroquímico de  $\text{H}_2\text{O}_2$  optimizado fue utilizado en un sistema biosensor formado por SPCEs modificados con AgTiPNPs y GOx. Este sistema podría ser utilizado para la detección de glucosa según el mecanismo que se ilustra en la Figura 10.12. Varias formas de modificación fueron evaluadas, como por ejemplo, la modificación inicial con AgTiPNPs y posterior modificación con GOx, una metodología contraria donde el electrodo se modifica primero con GOx, e incluso una modificación simultánea de una mezcla de ambos componentes fue evaluada. La metodología más adecuada fue la primera, ya que con las otras dos, no se obtenían una respuesta creciente significativa para diferentes concentraciones de glucosa, hecho que puede deberse a una posible pérdida de la funcionalidad de la GOx cuando se pone en contacto con una disolución de AgTiPNPs. Con el primer método y modificando la superficie electródica con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de GOx de 6  $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$  (valor optimizado), se obtuvo el calibrado de la Figura 10.13, con un rango dinámico entre 1 y 10 mM, y una sensibilidad de 0.18  $\mu\text{A mM}^{-1}$ . Estos resultados no fueron satisfactorios para evaluar las aplicaciones analíticas de este sensor en muestras más complejas. Por esta razón, y siguiendo la tendencia de los últimos años en llevar a cabo la determinación electroquímica no enzimática de glucosa se pasó a evaluar la posibilidad de usar otro tipo de MTiPNPs para la detección de este azúcar.

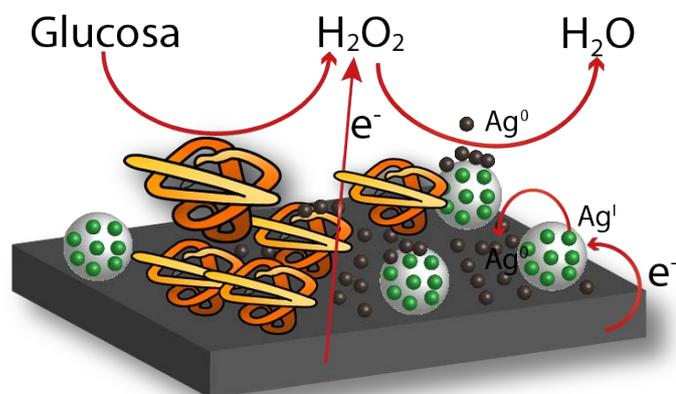


Figura 10.12: Esquema del mecanismo enzimático de oxidación de glucosa por GOx y reducción catalizada de  $H_2O_2$  en presencia de AgTiPNPs.

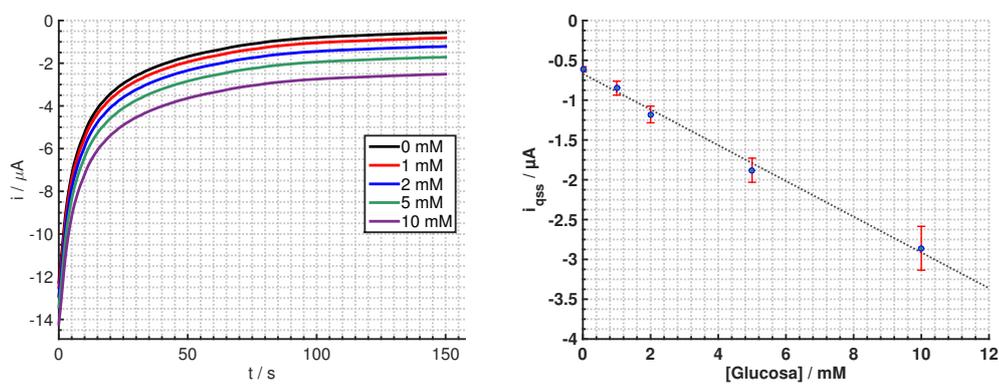
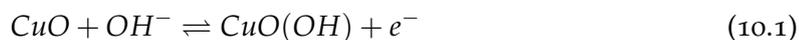


Figura 10.13: Respuesta cronoamperométrica a diferentes concentraciones de glucosa y recta de calibrado asociado.

10.4 DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA NO ENZIMÁTICA DE GLUCOSA USANDO  
NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE TITANIO MODIFICADAS CON COBRE

10.4.1 *Respuesta electroquímica de la glucosa en electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre*

Con el objetivo de evaluar el posible efecto electrocatalítico de las CuTiPNPs frente a la oxidación de glucosa, se estudió el comportamiento electroquímico de SPCEs sin modificar y modificados con 2  $\mu\text{L}$  de 2  $\text{mg mL}^{-1}$  de CuTiPNPs mediante LSV en un medio alcalino de NaOH 0.1 M en la ausencia y presencia de 1 y 10 mM de glucosa (Figura 10.14). Cuando existe glucosa en disolución y los electrodos son modificados con CuTiPNPs, se observa claramente un proceso de oxidación con un potencial de pico cercano a +0.6 V, cuya corriente de pico aumenta con la concentración de glucosa. Este proceso no se observa en los electrodos sin modificar, indicando un proceso específico de electrocatalisis de los electrodos modificados con CuTiPNPs frente a la oxidación de glucosa. Este resultado es coherente con el mecanismo de oxidación de glucosa típicamente considerado en electrodos de cobre (y sus derivados) en un medio alcalino. Como se ha descrito previamente en la literatura<sup>284</sup>, óxidos o hidróxidos de Cu(III) pueden funcionar como catalizadores de la oxidación de glucosa, probablemente de acuerdo a las siguientes reacciones con la ayuda de iones  $\text{OH}^-$ :



En esta reacción, la glucosa es oxidada a gluconolactona por las especies de Cu(III), que son generadas de forma electroquímica a partir de Cu(II), y el Cu(III) se reduce para regenerar el Cu(II). El consumo de Cu(III) en la reacción con la glucosa conduce a un proceso de oxidación de Cu(II) a Cu(III) incrementado (según el principio de Le Chatelier), que está directamente relacionado con la concentración de glucosa en la disolución.

Con el objetivo de entender el funcionamiento de las CuTiPNPs para electrocatalizar esta reacción, y generar Cu(III) en medio alcalino, se llevaron a cabo diferentes análisis de caracterización estructural. Por un lado, la presencia de iones metálicos en las MTiPNPs se puede confirmar por la disminución de la banda a 508  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro IR, atribuida

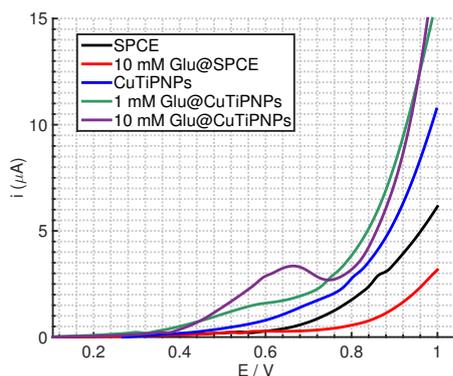


Figura 10.14: Respuesta LSV de SPCEs modificados con CuTiPNPs y sin modificar, en presencia y ausencia de glucosa.

a los grupos  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$ , y aparición de una banda sobre  $560\text{ cm}^{-1}$ , que indica la unión del metal con estos grupos. Esto significa que, el Cu(II) está unido al fosfato directamente (otros datos obtenidos, pero que no se discuten aquí es que el enlace podría ser algo más fuerte que una simple interacción electrostática (como formación de un complejo) y acorde a lo propuesto por otros autores y diferentes fosfatos<sup>176</sup>. Las imágenes de TEM demuestran que el producto obtenido (CuTiPNPs) tiene una forma morfológica similar al producto de partida (TiPNPs) y una distribución de tamaños similar, como se describió en el [Capítulo 8](#). Por tanto, no se observan especies de cobre diferentes a las CuTiPNPs, como si ocurría con las AgTiPNPs, en las que se podían observar dos fases diferenciadas. Por lo tanto, se concluye que la modificación electrodoica inicial corresponde a CuTiPNPs de manera cuantitativa. En el proceso electrodoico, se añade un medio alcalino como NaOH 0.1 M antes de llevar a cabo la oxidación. Para imitar este entorno, CuTiPNPs fueron colocadas en una disolución de NaOH 0.1 M durante 60 s, y a continuación, se llevó a cabo la precipitación, lavado y secado, para llevar a cabo una nueva caracterización estructural. El espectro IR mostró que incluso tras este tratamiento (ver [Figura 10.15](#)), la banda a  $560\text{ cm}^{-1}$  seguía estando disponible (incluso algo más acentuada, mientras que la banda a  $508\text{ cm}^{-1}$  de los grupos  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$  desapareció por completo. Esto indica que los grupos  $(\text{H}_2\text{PO}_4)^-$  que todavía estaban presentes han intercambiado sus protones por otras especies, algo lógico al pensar que estos grupos son ácidos y se colocan en un medio alcalino (y con  $\text{Na}^+$ ). Es interesante destacar que el medio alcalino no es capaz de extraer el metal de las nanopartículas, como si ocurría en un medio ácido. Las imágenes de TEM obtenidas tras este tratamiento alcalino ([Figura 10.16](#)), muestran nanopartículas similares (en tamaño y forma) a las iniciales (TiPNPs) y a las CuTiPNPs, indicando que no

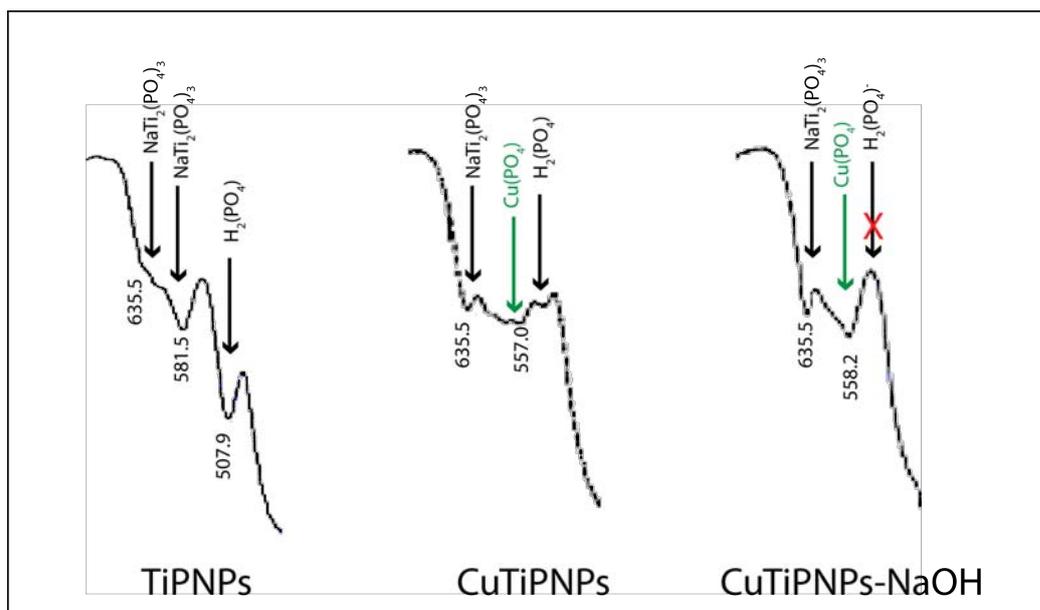


Figura 10.15: Espectro IR de TiPNPs, CuTiPNPs y CuTiPNPs tras su colocación en una disolución de NaOH 0.1 M durante 60 s.

ocurre ninguna variación en sus características morfológicas. Incluso tras el tratamiento en medio alcalino, no aparecen nuevas fases sólidas, hecho que se esperaría si óxidos o hidróxidos de cobre se formaran en estas condiciones. Como este medio no es capaz de extraer el metal de la estructura de la nanopartícula, no es posible la formación de este tipo de especies. Para confirmar el estado de oxidación en el que se encuentran las especies de cobre en las CuTiPNPs se llevaron a cabo análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Similares resultados se encuentran para el espectro de Cu<sub>2p</sub> de las CuTiPNPs antes y después del tratamiento con NaOH como se ilustra en la [Figura 10.17](#). La energía de enlace del componente más intenso (Cu-2p<sub>3/2</sub>) aparece a alrededor de 934 eV, hecho que unido a la presencia de los satélites hacia 940 eV, indica claramente la presencia de Cu<sup>2+</sup>, de la misma manera que la presencia de un satélite muy intenso para la componente del Cu-2p<sub>1/2</sub>. Estos resultados sugieren que no existe en la superficie de las nanopartículas ni Cu(I) ni Cu en estado elemental.

Por tanto, la caracterización de las CuTiPNPs iniciales y tras su pretratamiento en un medio alcalino deja claro que el Cu presente se encuentra formando parte de la estructura de las CuTiPNPs unido a los grupos fosfato y no se presenta en forma de óxido o hidróxidos en el medio alcalino. Por estas razones, se deduce que el Cu(II) presente en la

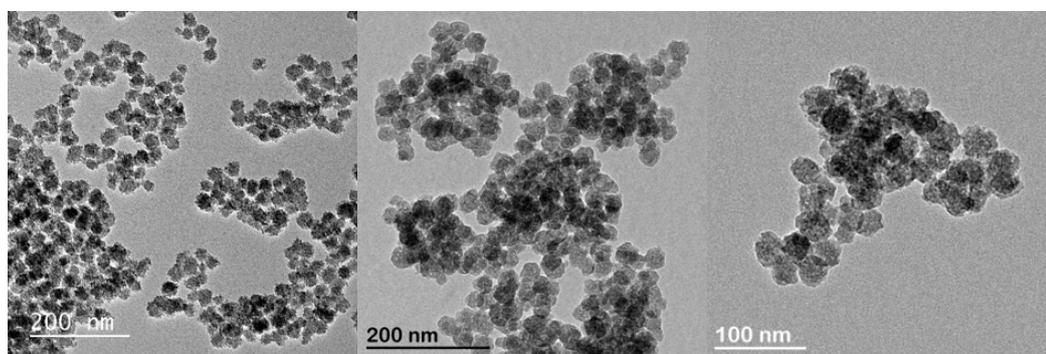


Figura 10.16: Imágenes de TEM de las TiPNPs, CuTiPNPs y CuTiPNPs tras su colocación en la disolución de NaOH 0.1 M.

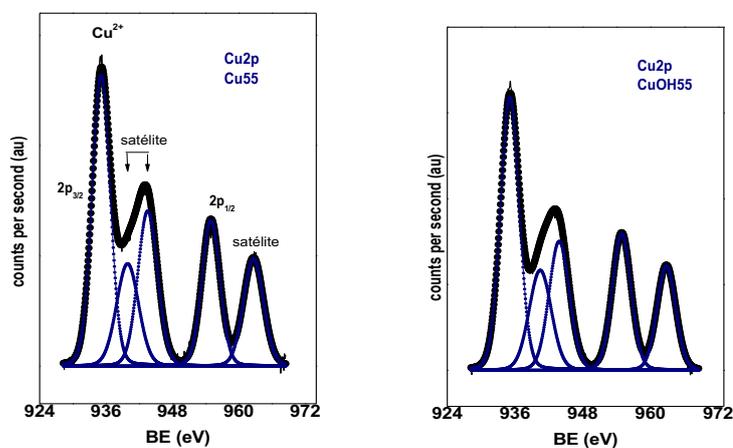


Figura 10.17: Espectro de XPS de CuTiPNPs y de CuTiPNPs tras su colocación en la disolución de NaOH 0.1 M.

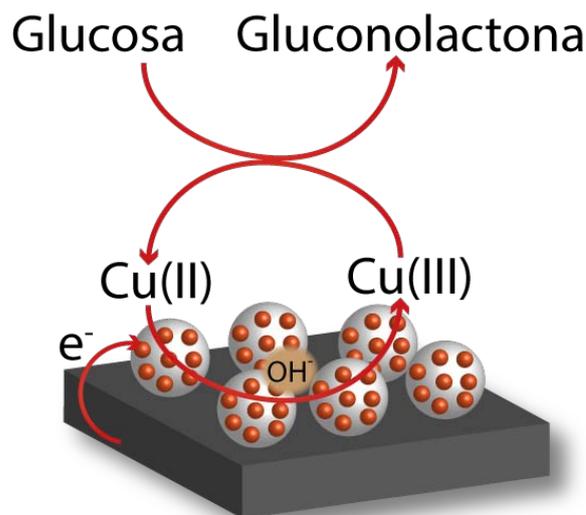


Figura 10.18: Esquema general de la oxidación catalítica de glucosa en presencia de CuTiPNPs.

estructura de las CuTiPNPs es el responsable de llevar a cabo la reacción electrocatalítica (ver esquema de la [Figura 10.18](#)).

Para generar la especie de Cu(III) como se ha comprobado de manera experimental por voltamperometría a un potencial relativamente bajo (+0.60 V), el Cu(III) debe estar fuertemente estabilizado en estas condiciones. Por la alta reactividad de las especies de Cu(III) y su generación solamente en la superficie del electrodo es realmente difícil llevar a cabo su caracterización para conocer con mayor exactitud su formación y la composición química de las especies resultantes de la oxidación y que intervienen en la reacción con la glucosa. Sin embargo, se proponen dos posibles mecanismos:

1. Si el Cu(II) estuviera unido a dos oxígenos de un mismo grupo fosfato (o de diferentes fosfatos) se tendría una especie similar a la siguiente (de manera simplificada):  $-\text{P-O-Cu-O-P}-$ . El Cu(II) en esta especie está ciertamente estabilizado por los oxígenos que son capaces de unirse a ellos. Tras la electro-oxidación en el medio alcalino, se podría formar la siguiente especie de Cu(III):  $-\text{P-O-Cu(OH)-O-P}$ , que estaría en este caso estabilizada además de por los oxígenos de los fosfatos por un grupo  $\text{OH}^-$ . En un óxido de cobre(II), la especie formada en esta electro-oxidación en medio alcalino es típicamente  $\text{CuO(OH)}$ , por lo que sería un proceso muy similar. Este mecanismo es el más probable de ocurrir en estas condiciones, ya que el Cu(III) en esta configuración estaría estabilizado el suficiente tiempo para producir la oxidación de la

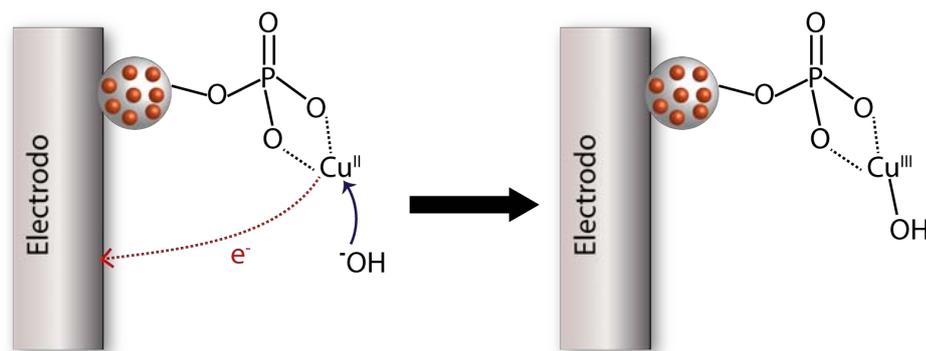


Figura 10.19: Mecanismo general propuesto para la formación de la especie de Cu(III) en las Cu-TiPNPs.

glucosa y podría ser formado de manera análoga a un óxido. Un esquema propuesto del mecanismo de esta reacción química se ilustra en la [Figura 10.19](#).

- Si el Cu(II) estuviera unido a un oxígeno de un grupo fosfato y además a un grupo hidróxido (-P-O-Cu-OH), tras la reacción de electro-oxidación el Cu(III) estaría estabilizado por un nuevo grupo OH<sup>-</sup>, formando una especie con estructura general de -P-O-Cu(OH)<sub>2</sub>. Este mecanismo involucraría el desplazamiento previo de un grupo fosfato del Cu(II) por un grupo OH<sup>-</sup> del medio alcalino, aunque no está claro que esto pudiera ocurrir.

Otra posibilidad sería que la electro-oxidación de las especies de Cu(II), sea un proceso capaz de extraer el metal de la estructura de las CuTiPNPs y generar un óxido o hidróxido sobre la superficie electródica. Sin embargo, este mecanismo conllevaría una mayor reorganización de enlaces (rotura de enlaces de los fosfatos de cobre, y creación de nuevos enlaces óxidos o hidróxidos), que teóricamente tendría una cinética más lenta que los mecanismos propuestos anteriormente y que se traduciría en un desplazamiento del potencial de la oxidación a potenciales más positivos (mayor energía). El proceso voltamperométrico de Cu(II) a Cu(III) aparece a un potencial cercano +0.6 V, que es muy similar al potencial al que aparece la oxidación de óxidos de Cu(II) descrita en diferentes trabajos publicados<sup>285,286</sup>, donde tras la oxidación de Cu(II) a Cu(III), solamente se genera un nuevo enlace para dar CuO(OH). Por tanto, la energía necesaria para oxidar el Cu(II) de las CuTiPNPs es similar al que se describe en estos casos, sugiriendo que lo más probable sea que la reacción se produzca según el primer mecanismo propuesto. Este hecho indicaría la formación de especies de Cu(III) estabilizadas por grupos fosfato, aspecto realmente

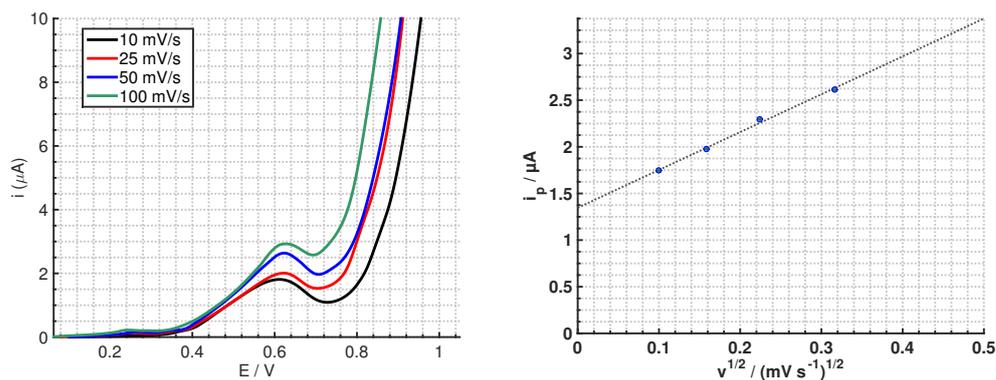


Figura 10.20: Respuesta LSV para diferentes velocidades de barrido de electrodos modificados con CuTiPNPs en presencia de 10 mM de glucosa. Respuesta lineal obtenida entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

interesante, y que debería confirmarse con otros estudios (aunque es complicado por la alta reactividad de las especies de Cu(III).

Con el objetivo de conocer más información sobre proceso electroquímico, se realizó un estudio de la oxidación catalítica de glucosa en los SPCEs modificados con CuTiPNPs. Se registraron voltamperogramas LSV de una disolución de 10 mM de glucosa en NaOH 0.1 M a varias velocidades de barrido desde 10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$  (mostrados en la [Figura 10.20](#)). Este estudio resultó en una relación lineal entre la corriente de pico anódica y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, indicando que la etapa limitante de la velocidad de la reacción electroquímica fue la difusión de las especies a la superficie electródica. Este hecho es coherente con los resultados encontrados por otros autores utilizando electrodos de níquel o cobre<sup>287</sup>. Aunque la especie de cobre que está sobre la superficie electródica es responsable principal de la reacción (Cu(II) a Cu(III)), otras especies como la glucosa o grupos  $\text{OH}^-$  del medio también están involucrados, por lo que parece que la difusión de alguna de estas especies es responsable de la etapa limitante de la reacción, y que no interacciona fuertemente con la superficie electródica o con las nanopartículas.

#### 10.4.2 Optimización de las condiciones experimentales

El rendimiento del CuTiPNPs-SPCE para la oxidación de la glucosa fue optimizado variando las diferentes condiciones experimentales que podían afectar a la señal analítica. Se eligió como medio electrolítico NaOH 0.1 M ya que es el medio estándar utilizado para

la detección de glucosa electrocatalítica con nanomateriales de cobre o níquel, y como se comprobó en el anterior apartado parecía funcionar correctamente.

El efecto de la cantidad de CuTiPNPs depositadas sobre la superficie electródica fue evaluado. Se modificaron varios SPCEs con 4  $\mu\text{L}$  de una dispersión de CuTiPNPs en  $\text{H}_2\text{O}$  con diferentes concentraciones (1, 2, 5, 7, 10, 20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) y se llevó a cabo las medidas cronoamperométricas aplicando un potencial de +0.6 V durante 60 s. Como se puede observar en la [Figura 10.21](#), se encontró una variación tanto para la señal del fondo (NaOH 0.1 M) como para la señal obtenida para una disolución que contenía 1 mM de glucosa. Por la variación de ambos factores, se consideró la relación señal/fondo como el parámetro a optimizar. Este parámetro llega a un máximo para una concentración de CuTiPNPs de 5  $\text{mg mL}^{-1}$  y a partir de esa concentración, la relación comienza a disminuir, probablemente debido a la dificultad de generar una película homogénea sobre la superficie electródica, resultando en una peor electrocatalisis. Por otro lado, se comprobó el efecto del potencial de detección aplicado en la relación entre la señal y el fondo. Se utilizó una disolución de glucosa 0.5 mM para la señal analítica y NaOH 0.1 M como señal del fondo, y se varió el potencial de detección entre (+0.3, +0.4, +0.5 y +0.6 V). La relación entre la señal analítica y el blanco aumentó hasta un potencial de +0.5 V ([Figura 10.22](#)), a partir del cual, el aumento de la señal del blanco hace disminuir esta relación señal/blanco. Por tanto, +0.5 V fue seleccionado como el potencial más adecuado para la determinación de glucosa.

#### 10.4.3 Comportamiento analítico del detector nanoestructurado

Con el objetivo de evaluar las características analíticas del detector electroquímico desarrollado para la determinación de glucosa, concentraciones crecientes de glucosa en NaOH 0.1 M fueron medidas con diferentes detectores usando las condiciones experimentales optimizadas. La respuesta cronoamperométrica mostró una relación lineal frente a la concentración de glucosa desde 25  $\mu\text{M}$  a 2 mM ([Figura 10.23](#)), con un coeficiente de correlación de 0.997 ( $R^2$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:  $i_p = 0.401 (\pm 0.009) [\text{Glucosa}] + 0.023 (\pm 0.006)$ ,  $R^2=0.997$  ( $n=3$ ). Un límite de detección de 7  $\mu\text{M}$  fue calculado. El detector desarrollado usando SPCEs modificados con CuTiPNPs exhibió un comportamiento excelente para la determinación de glucosa, con un amplio rango lineal, una sensibilidad de 7.81  $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  y un bajo límite de detección. Este límite de detección es mucho menor que los valores normales que se encuentran en la mayoría de muestras de interés (muestras clíni-

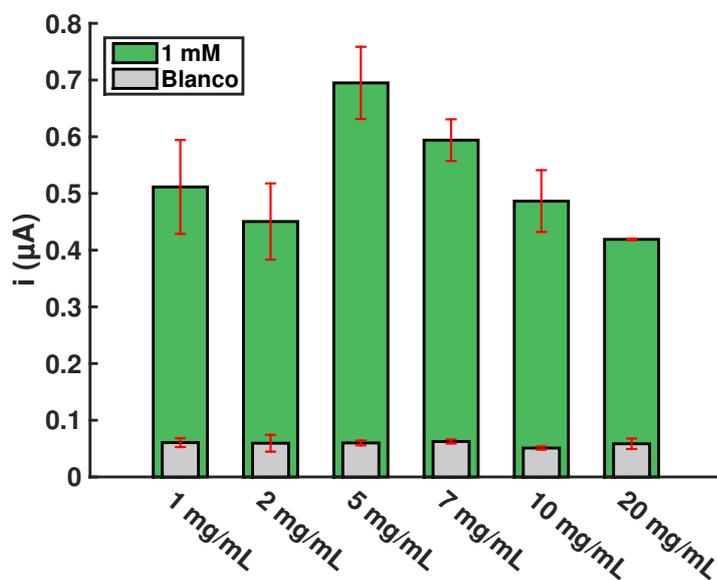


Figura 10.21: Efecto de la concentración de CuTiPNPs en la respuesta cronoamperométrica en presencia y ausencia de 1 mM de glucosa.

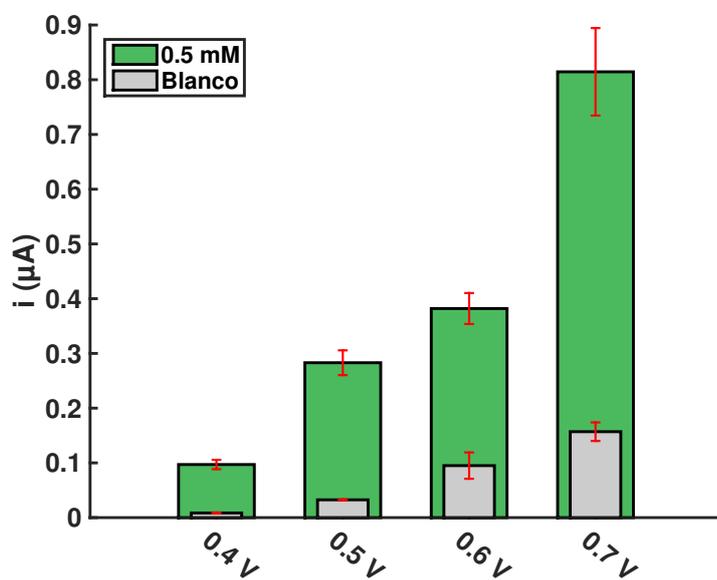


Figura 10.22: Efecto del potencial de deposición en la respuesta cronoamperométrica en presencia y ausencia de 0.5 mM de glucosa.

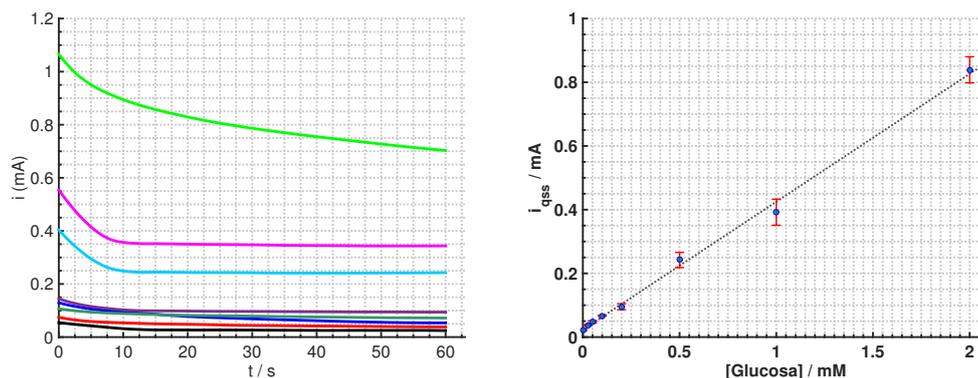


Figura 10.23: Respuesta cronoamperométrica obtenida para concentraciones crecientes de glucosa y recta de calibrado asociada.

cas o alimentarias), por lo que el detector podría ser utilizado para determinar glucosa en este tipo de muestras.

Las características analíticas de diferentes electrodos serigrafiados de níquel o cobre para la determinación no enzimática de glucosa se muestran en la [Tabla 10.1](#). Aunque otros electrodos metálicos han sido descritos en la literatura (especialmente con metales nobles), la tendencia es utilizar materiales más baratos como cobre y níquel. Dos de los electrodos serigrafiados descritos parecen destacar considerando las características analíticas obtenidas. Por ejemplo, el trabajo publicado por Liang-Sung et al.<sup>288</sup>, donde con la ayuda de grafeno se consigue un detector muy sensible y un muy bajo límite de detección. Sin embargo, las características analíticas son estimadas usando el detector en un sistema de análisis por inyección en flujo, que típicamente mejora los límites de detección. El electrodo modificado con estructuras 3D de níquel nanoporosas<sup>289</sup> también muestra un gran rendimiento. Este detector es utilizado en una celda electroquímica convencional de mayor volumen y con agitación, mejorando el transporte de masa y por tanto, el límite de detección. En comparación con los otros detectores no enzimáticos descritos usando electrodos serigrafiados, el detector desarrollado con CuTiPNPs es altamente competitivo en términos del rango lineal y el límite de detección. Además, la utilización de tarjetas serigrafiadas de 8 canales conduce a la determinación simultánea de 8 muestras de glucosa, que resulta en un ahorro de tiempo considerable.

#### 10.4.3.1 Estudios de precisión y estabilidad del detector nanoestructurado

Un estudio de precisión del detector no enzimático se llevó a cabo evaluando la reproducibilidad de 8 diferentes electrodos modificados con CuTiPNPs utilizando las condiciones

| Material electródico             | Rango lineal ( $\mu\text{M}$ ) | LOD ( $\mu\text{M}$ ) | Ref.               |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------|
| CuTiPNPs                         | 25 - 2000                      | 7                     | -                  |
| Cu nanobelts                     | 10 - 1130                      | 10                    | [ <sup>290</sup> ] |
| Cu/Grafeno                       | 0.12 - 500                     | 0.03                  | [ <sup>288</sup> ] |
| CuOSPEs                          | 50 - 1200                      | 4                     | [ <sup>285</sup> ] |
| NiCu nanohilos                   | 50 - 1000                      | 40                    | [ <sup>291</sup> ] |
| Ni nanohilos                     | 50 - 1000                      | -                     | [ <sup>292</sup> ] |
| NiCo                             | 25 - 3700                      | -                     | [ <sup>293</sup> ] |
| Carbono nanoporoso con Ni        | 20 - 240                       | 10                    | [ <sup>294</sup> ] |
| Nanoestructuras 3D porosas de Ni | 0.5 - 4000                     | 0.07                  | [ <sup>289</sup> ] |
| NiNPs-chitosan-rGO               | 200 - 9000                     | 4.1                   | [ <sup>295</sup> ] |

Tabla 10.1: Características analíticas de varios detectores de glucosa no enzimáticos usando electrodos serigrafados.

optimizadas y midiendo una disolución de 300  $\mu\text{M}$  de glucosa en NaOH 0.1 M. El detector desarrollado mostró resultados precisos con una RSD promedio de 8.5 %. Para evaluar la estabilidad a largo plazo del detector, varios SPCEs fueron modificados con CuTiPNPs usando las condiciones optimizadas y fueron almacenados a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo. La respuesta cronoamperométrica de los detectores fue evaluada por triplicado durante un período de 6 semanas utilizando una disolución de 200  $\mu\text{M}$  de glucosa en NaOH 0.1 M. Como se muestra en la [Figura 10.24](#), el dispositivo mantuvo la respuesta inicial durante el período de tiempo evaluado, verificando una buena estabilidad desde su fabricación. Este hecho es debido a la buena estabilidad de las nanopartículas de fosfato de titanio como del Cu(II) de su estructura y de la película depositada sobre la superficie electródica, que mantiene sus condiciones iniciales.

#### 10.4.3.2 Estudio de interferentes

Con el objetivo de evaluar la selectividad del detector frente a la oxidación de glucosa, las posibles interferencias de algunas especies fueron valoradas. Por ejemplo, algunas especies electroactivas que pueden coexistir en muestras clínicas como dopamina (DA), ácido úrico (UA) y ácido ascórbico (AA) fueron medidas con el detector en las mismas condiciones que para la glucosa, utilizando una concentración de 0.1 mM de las especies interferentes en NaOH 0.1 M. Considerando que en el suero humano la concentración de glucosa es al menos 30 veces mayor que la concentración de AA, DA o UA<sup>296</sup>, una disolución de 1 mM de glucosa (sólo 10 veces mayor) fue utilizada para comparación. Una pequeña respuesta del detector fue observada para DA y UA en comparación a la señal del

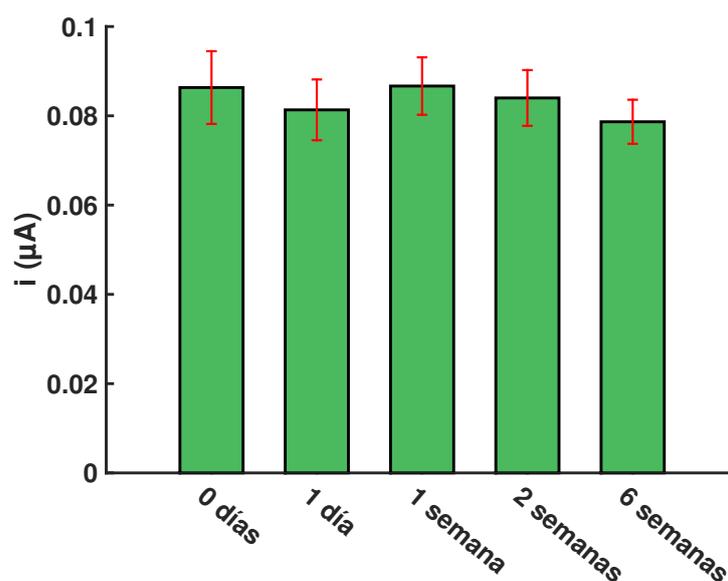


Figura 10.24: Estudio de estabilidad del detector nanoestructurado tras diferentes tiempos de almacenamiento.

blanco (Figura 10.25A). Sin embargo, la señal cronoamperométrica para 1 mM de glucosa fue significativamente mayor que la señal obtenida para estas especies. Por tanto, el detector parece mostrar una buena selectividad en la detección de glucosa en muestras clínicas. Además, para evaluar la capacidad del detector electroquímico para control alimentario, la respuesta frente a otros azúcares como fructosa, sacarosa y xilosa fue estudiada. La señal obtenida para 100  $\mu\text{M}$  de cada azúcar comparada a la misma concentración de glucosa se muestra en la Figura 10.25B. El detector electroquímico respondió mínimamente frente a la xilosa y la fructosa, pero fue significativamente menor que la respuesta para la glucosa (por lo que la respuesta podría ser debido a pequeñas impurezas en estos reactivos). Por tanto, se puede concluir que el detector tiene una buena selectividad hacia la glucosa frente a otros azúcares.

#### 10.4.4 Determinación de glucosa en muestras reales

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del detector electroquímico no enzimático desarrollado en este trabajo en muestras reales, se llevó a cabo la determinación de glucosa en una muestra agroalimentaria (miel) y en una muestra clínica (sangre). Para la muestra de miel, con una alta concentración de glucosa se llevó a cabo una dilución

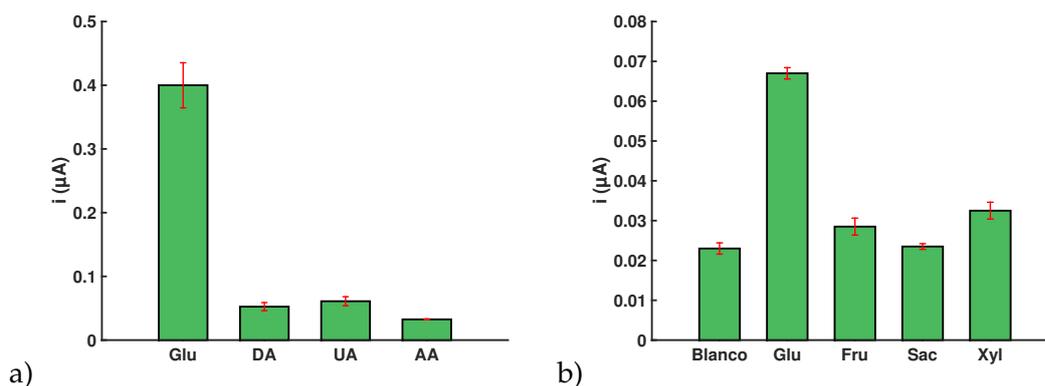


Figura 10.25: Respuesta interferente del detector hacia otras especies como DA, UA y AA (a) y hacia otros azúcares diferentes de glucosa (b).

adecuada como se describió en el [Capítulo 2](#), obteniendo una disolución con una cantidad de glucosa que estuviera dentro del rango del calibrado. Se midió por triplicado esta muestra y se obtuvo un valor para la concentración de glucosa de  $29 \pm 3$  g/100g muestra. Este valor es muy cercano al valor obtenido ( $29.3 \pm 0.4$  g/100g muestra) con un sensor previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación que fue validado para diferentes muestras<sup>297</sup>. Por tanto, se puede decir que el detector electroquímico presentó un buen comportamiento con este tipo de muestras siendo muy selectivo a la glucosa frente a otros azúcares como fructosa que posee esta muestra. Además, con la dilución realizada (1:100) no se observan problemas de matriz significativos.

Por otro lado, se realizó una medida de la glucosa en una muestra clínica como es la sangre. Los resultados obtenidos fueron validados con un glucómetro comercial. Para obtener una muestra más simple eliminando una fracción importante de las proteínas presentes en la sangre, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 3 minutos para llevar a cabo la separación entre el plasma y el resto de la sangre. De la misma forma que para la miel, como la concentración normal de glucosa en sangre es bastante más elevada que el rango del calibrado del detector, se llevó a cabo una dilución en NaOH y poder dar un resultado adecuado. Esta dilución fue menor, en este caso, 1:10. Sin embargo, los resultados obtenidos para esta muestra estaban por debajo del valor real obtenido por el glucómetro comercial, indicando problemas de matriz de la muestra. Por tanto, se llevó a cabo un análisis por adiciones estándar, obteniendo un resultado más cercano al valor obtenido por el glucómetro ( $100 \pm 11$  mg dL<sup>-1</sup> frente a  $104 \pm 5$  mg dL<sup>-1</sup> con el glucómetro). Por tanto, parece ser que existen interferencias de matriz en el caso del análisis directo de sangre con este detector, aunque se haya separado la parte acuosa y realizado la dilución

correspondiente en NaOH. Sin embargo, un análisis por adiciones estándar parece ser un método adecuado para utilizar el detector no enzimático desarrollado con muestras más complejas como una muestra clínica.

## 10.5 CONCLUSIONES

En este capítulo, se describen algunos efectos electrocatalíticos de las MTiPNPs hacia reacciones electroquímicas muy importantes en la actualidad, demostrando que estas nanopartículas también pueden ser utilizadas para este tipo de aplicaciones electroanalíticas. En primer lugar, la reducción del metal de la MTiPNPs sobre la superficie electródica permite la generación de nanopartículas metálicas, como se observa para las AgTiPNPs, que son capaces de involucrarse en reacciones electrocatalíticas *in situ* en el momento de su generación. Esto evita la posibilidad de que la superficie de las nanopartículas metálicas se encuentre pasivada, hecho que puede inhibir la capacidad electrocatalítica, si la superficie nanoestructurada se genera de manera externa y previa al momento de llevar a cabo la reacción electroquímica catalizada. Además, la presencia localizada del metal sobre la superficie electródica dentro de la estructura de las MTiPNPs, podría causar ciertas diferencias en el mecanismo de electrodeposición de las nanopartículas metálicas, y conferir diferentes propiedades en comparación a una electrodeposición convencional directamente sobre la superficie del electrodo.

El efecto electrocatalítico de las AgTiPNPs frente a la HER es utilizado para cuantificar estas nanopartículas y se compara con un método voltamperométrico, obteniendo resultados similares para las características analíticas. Mediante un mecanismo similar, el efecto electrocatalítico de las AgTiPNPs frente a la reducción de  $H_2O_2$  es demostrado. Esta reacción catalizada se utiliza como método de detección en un biosensor enzimático para la detección de glucosa.

Las CuTiPNPs muestran un efecto catalítico frente a la oxidación de glucosa, que es utilizado para la optimización de un detector electroquímico con el objetivo de su detección en muestras agroalimentarias y clínicas. La generación de especies de Cu(III) generadas electroquímicamente en la estructura de estas nanopartículas permite su reacción con la glucosa presente. Un mecanismo para la generación de estas especies de Cu(III) tras la electro-oxidación de Cu(II) es propuesto, sugiriendo que los grupos fosfatos pueden actuar como estabilizadores capaces de mantener el Cu(III) disponible el tiempo suficiente para poder llevar a cabo la reacción con la glucosa. La confirmación de este hecho su-

pondría, probablemente, la primera descripción de especies de Cu(III) estabilizadas por grupos fosfato.



## CONCLUSIONES FINALES



## CONCLUSIONES GENERALES

---

Aunque en cada capítulo se han ido describiendo las conclusiones específicas del trabajo presentado, a continuación se resumen los resultados obtenidos con las conclusiones generales de toda la Tesis Doctoral:

- Se ha estudiado la respuesta electroquímica localizada de electrodos serigrafiados de carbono con una técnica muy poderosa capaz de proporcionar información con alta resolución espacial como la Microscopía de celda electroquímica de barrido. Se ha demostrado que la superficie tan heterogénea de electrodos serigrafiados de carbono no responde de la misma manera para reacciones electroquímicas de esfera interna como de esfera externa. Para una reacción de esfera externa, como es la reducción del hexaaminrutenio, no se observa una actividad electroquímica diferente a lo largo de toda la superficie electródica, siendo una reacción con una cinética rápida en este tipo de electrodos. La diferente microestructura del grafito que contiene la superficie electródica no afecta a la transferencia electrónica de esta reacción electroquímica. Este hecho demuestra que en los electrodos serigrafiados de grafito, los defectos de la microestructura no afectan significativamente a la transferencia electrónica en este tipo de reacciones, de forma contraria a los resultados encontrados en estudios previos realizados en la macroescala (donde la respuesta se obtiene de manera global para toda la superficie). El estudio de una reacción electroquímica de esfera interna como la oxidación de dopamina ha puesto de manifiesto la diferente respuesta de la superficie electródica serigrafiada, obteniendo una correlación entre la estructura microcristalina del grafito del electrodo y la respuesta electroquímica. El estudio voltamperométrico a diferentes concentraciones y velocidades de barrido ha permitido separar tres factores que afectan a esta reacción: adsorción, cinética y bloqueo de la superficie por productos de la reacción. Las zonas de la superficie serigrafiada que contienen grafito con menor densidad de defectos muestran una mayor actividad, que se traduce en mayor cantidad de adsorción y una cinética más rápida, dando lugar a una mayor cantidad de productos bloqueantes en la superficie. Estos

resultados han permitido obtener un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de una superficie electródica tan compleja y heterogénea como es la que poseen los electrodos serigrafiados.

- El estudio electroquímico de quantum dots de cadmio fue utilizado para la determinación del tamaño de quantum dots en una muestra desconocida, en buen acuerdo con los resultados obtenidos mediante técnicas espectroscópicas de rutina. La cantidad de átomos metálicos en el núcleo del nanocrystal es proporcional al tamaño, y por tanto, su determinación puede correlacionarse con el diámetro de las nanopartículas, hecho que no se había utilizado con este objetivo anteriormente utilizando técnicas electroquímicas. Este método permite la detección de tamaños en una muestra homogénea de quantum dots con una alta sensibilidad capaz de resolver diferencias de tamaño muy bajas. Además, se desarrolló un método electroquímico rápido, sensible y de bajo coste para la detección de este tipo de nanopartículas tanto en medio orgánico como en un medio acuoso. A continuación, se ha desarrollado y optimizado un método para la detección *in situ*, sobre electrodos serigrafiados, de quantum dots utilizados como marca electroquímica de biosensores, obteniendo unas características analíticas muy interesantes y simplificando los procedimientos publicados hasta la fecha. Esta metodología ha permitido desarrollar dos tipos de biosensores electroquímicos. En primer lugar, se puso a punto un biosensor con formato competitivo para la detección de biotina, mostrando su buen funcionamiento con una reacción de afinidad relativamente simple. Además, la metodología fue aplicada a un sistema biosensor más complejo y con mayor utilidad como es la detección de biomarcadores de la enfermedad celíaca. En primer lugar, se desarrolló una estrategia multi-etapa para la detección de anticuerpos IgG anti-transglutaminasa, y a continuación, el sistema fue mejorado para la detección de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa. Una simple pero novedosa modificación hidrofílica de la superficie del transductor con el elemento de reconocimiento resultó en un alta carga proteica y permitió minimizar las adsorciones inespecíficas y eliminar la etapa de bloqueo adicional, simplificando el sistema global. A continuación, se evaluó la posibilidad de realizar el bioensayo en una sola etapa, disminuyendo el tiempo de análisis significativamente. Por tanto, la detección *in situ* de quantum dots sobre la superficie de un transductor serigrafiado ha mostrado su utilidad en el desarrollo de biosensores electroquímicos desechables para la detección de biomoléculas de interés, tanto en un formato competitivo como en un formato tipo *sandwich*. Por otro lado, se ha estudiado y descrito, por

primera vez, la electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots en una superficie electródica. La nucleación de plata ocurre preferentemente en la superficie de quantum dots en comparación a un electrodo de carbono, algo que permite su electrodeposición selectiva generando, en un inicio, nanopartículas tipo Janus con dos fases diferenciadas. Esta metodología permite generar superficies nanoestructuradas localizadas solamente en posiciones donde existen quantum dots. La fuerte interacción entre la plata y la superficie de los quantum dots resulta en un proceso de redisolución muy selectivo que puede ser utilizado con fines analíticos para la detección sensible de quantum dots de manera simple sin llevar a cabo una digestión ácida de las nanopartículas.

- Se estudiaron diferentes características electroquímicas de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales electroactivos, que habían sido recientemente descritas en la literatura. La capacidad de introducir los diferentes metales en la estructura de estas nanopartículas por intercambio iónico abre la puerta a un nuevo conjunto de aplicaciones electroanalíticas. Dos tipos de aplicaciones electroanalíticas fueron evaluadas con estas nanopartículas: como marca de biosensores electroquímicos y como catalizador de reacciones electroquímicas. En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de estas nanopartículas mediante la detección del metal electroactivo introducido en su estructura. Diferentes metales electroactivos fueron introducidos en las nanopartículas como cadmio, bismuto, cobre, plata y mercurio. Se estudió el comportamiento electroquímico de estas nanopartículas con el objetivo de encontrar las más adecuadas para su utilización como marca electroquímica de biosensores multianalito. Las nanopartículas de cadmio fueron utilizadas en un biosensor para la detección de biotina, permitiendo su comparación directa con los resultados obtenidos para los quantum dots. Un comportamiento analítico similar fue encontrado para ambas nanopartículas, que puede estar limitado por la capacidad de detección electroquímica del metal. Como consecuencia de la alta capacidad de intercambio metálico, gran sensibilidad y posibilidad de resolver sus procesos de redisolución, las nanopartículas modificadas con cobre y mercurio fueron las elegidas en el desarrollo de un biosensor multianalito para la detección de dos biomarcadores de la enfermedad celíaca. Los resultados, incluso en una configuración multianalito, mostraron una mejora en la sensibilidad de la detección en comparación a los resultados con los quantum dots, posiblemente debido a la mayor carga metálica de estas nanopartículas. Para estas aplicaciones bioanalíticas, las nanopartículas fueron

funcionalizadas con neutravidina, y se siguieron dos métodos: un método propuesto en la bibliografía mediante el atrapamiento polimérico y un nuevo método, más sencillo, que permite una unión más directa entre la proteína y las nanopartículas de fosfato de titanio. Dos estrategias electrocatalíticas con estas nanopartículas fueron también propuestas, por un lado, nanopartículas modificadas con plata fueron reducidas *in situ* con la especie de interés, demostrando que las nanopartículas de plata generadas sobre la superficie electródica son las responsables de la catálisis. Dos reacciones fueron estudiadas: la reacción de evolución de hidrógeno y la reducción de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la electrocatálisis directa de las nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con cobre frente a la oxidación de la glucosa fue demostrada, aplicándose a la determinación no enzimática de este azúcar. Esta reacción se produce mediante la reacción de glucosa con una especie de Cu(III), generalmente en un electrodo formando un recubrimiento óxido. En este trabajo, se propone un mecanismo de reacción donde la especie de Cu(III) generada está unida al grupo fosfato de las nanopartículas que sería capaz de estabilizarla durante un tiempo suficiente para llevar a cabo la reacción de catálisis. La determinación no enzimática de glucosa con estas nanopartículas presenta una buena sensibilidad, con la detección de concentraciones en el orden de  $\mu\text{M}$ , y buen comportamiento en muestras reales. Por tanto, el trabajo presentado aquí demuestra por primera vez las aplicaciones electrocatalíticas de las nanopartículas de fosfato de titanio. Los diferentes metales que pueden introducirse en estas nanopartículas podrían permitir la catálisis de otras reacciones electroquímicas no estudiadas en este trabajo.

En resumen, esta Tesis Doctoral ha permitido conocer en mayor profundidad el comportamiento de la superficie de electrodos serigrafiados de carbono, muy utilizados en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Además, se proponen varios métodos electroquímicos para la detección del tamaño y concentración de quantum dots, su utilización como marca de biosensores integrados desechables, y su aplicación a la generación localizada de superficies nanoestructuradas. Por último, se estudian las propiedades electroquímicas y se evalúan las mejores nanopartículas de fosfato de titanio modificadas con metales electroactivos para su utilización como marca de biosensores multianalito y en aplicaciones electrocatalíticas.

## GENERAL CONCLUSIONS

---

Although the specific conclusions of the work were presented in each chapter, the main results and general conclusions are summarized below:

- The localized electrochemical response of screen-printed carbon electrodes with a very powerful technique capable of providing information with high spatial resolution such as scanning electrochemical cell microscopy was studied. The heterogeneous surface of screen-printed carbon electrodes does not respond in the same way for inner- and outer-sphere electrochemical reactions. For an outer sphere reaction, as the hexaammineruthenium reduction, an homogeneous electrochemical activity was observed over the entire electrode surface, bearing a reaction with rapid kinetics in this type of electrodes. The different microstructure of the graphite-composed electrode does not affect the electronic transfer of this reaction. This fact shows that at screen-printed carbon electrodes, the defects of the graphite microstructure does not significantly affect the electron transfer in this reaction, in contrast to the results found in previous macroscale studies (where the response is obtained as an average of the entire surface). The study of inner sphere electrochemical reaction such as the dopamine oxidation has shown the different response of the screen-printed surface, obtaining a correlation between the microcrystalline graphite structure and the electrochemical activity. Voltammetric study at different concentrations and scan rates allowed to separate three different factors affecting this reactions: adsorption, kinetics and blocking of the surface by reaction products. Areas of the screen-printed surface containing graphite with lower defect density showed higher activity, resulting in greater amount of adsorption and faster kinetics, and a larger amount of blocking products on the surface. These results have provided a better understanding of the behavior of such a complex and heterogeneous surface as the screen-printed surface.
- The electrochemical study of cadmium-based quantum dots was used for determining the size of quantum dots in an unknown sample, in good agreement with the results obtained by routine spectroscopic techniques. The amount of metal atoms in

the core of the nanocrystal is proportional to the size, and thus, its determination can be correlated with the diameter of the nanoparticles, strategy which had not been used for this purpose using electrochemical techniques. This method allows the detection in a homogeneous sample of quantum dots size with high sensitivity capable of resolving differences of very low size. Moreover, a fast, sensitive and inexpensive electrochemical detection method of such nanoparticles in both organic and aqueous media was developed. This knowledge was applied to the development and optimization of a method for the *in situ* detection of quantum dots used as electrochemical label for disposable biosensors, obtaining interesting analytical characteristics and simplifying the procedures published so far. This methodology has helped to develop two types of electrochemical biosensors. First, a competitive biosensor to detect biotin was performed, showing its good operation with a relatively simple affinity reaction. In addition, the methodology was applied to a more complex biosensor system for the detection of celiac disease biomarkers. A multi-step strategy for the detection of anti-transglutaminase IgG antibodies was developed, and then the system was improved for the detection of anti-transglutaminase IgA antibodies. A simple but novel hydrophilic surface modification of the transducer with the recognition element resulting in a high protein load and allowing to minimize the non-specific adsorptions and eliminate the additional blocking step. Then, the possibility of a single-step bioassay, significantly reducing the analysis time, was evaluated. The *in situ* detection of quantum dots on the surface of the screen-printed electrodes has proven useful in the development of disposable electrochemical biosensors for the detection of biomolecules of interest, in a competitive format and in a sandwich format. Furthermore, the selective electrodeposition of silver on quantum dots was described for the first time and studied in depth. The silver nucleation occurs preferably on the surface of quantum dots in comparison to the carbon electrode, which allows the selective electrodeposition generating, initially, Janus-like nanoparticles with two different phases. This methodology can generate localized nanostructured surfaces only in positions where there are quantum dots. The strong interaction between silver and the surface of quantum dots results in a very selective stripping process that can be used for analytical purposes for the sensitive detection of quantum dots in a simple way without performing the acid digestion of the nanocrystals.

- Different electrochemical characteristics of titanium phosphate nanoparticles modified with electroactive metals were studied. The ability to introduce different metals in structure of these nanoparticles by ion exchange opens the door to a new set of electroanalytical applications. Two types of electroanalytical application were evaluated with these nanoparticles: as label for electrochemical biosensors and as catalyst for electrochemical reactions. The electrochemical behavior of these nanoparticles was studied by detecting the electroactive metal introduced into its structure. Different metals were evaluated such as cadmium, bismuth, copper, silver and mercury, in order to find the most suitable for the simultaneous detection in multiplexing biosensors. Cadmium nanoparticles were used in a biosensor for the detection of biotin, allowing the direct comparison with the results obtained for the quantum dots. A similar analytical behavior was found for both nanoparticles, which may be limited by the ability of the metal electrochemical detection. As a result of the high metal exchange capacity, high sensitivity and the ability to resolve their stripping processes, the nanoparticles with copper and mercury were chosen for the development of the multiplexing biosensor for the detection of two celiac disease biomarkers. The results, even in a multiplexing setup, showed an enhanced sensitivity compared to the results obtained with quantum dots, possibly due to the high metal loading of these nanoparticles. For these bioanalytical applications, the nanoparticles were functionalized with neutravidin, and two methods were evaluated: a polymer entrapment method proposed in the literature and a new method, which allows a more direct binding between the protein and the titanium phosphate nanoparticles. Two electrocatalytic strategies using these nanoparticles were also proposed, on the one hand, silver-modified titanium phosphate nanoparticles were reduced in situ with the species of interest, showing that the silver nanoparticles generated on the electrode surface are responsible for the catalysis. Two reactions were studied: the hydrogen evolution reaction and the reduction of hydrogen peroxide. On the other hand, the electrocatalysis of glucose oxidation with copper-modified titanium phosphate nanoparticles was studied and applied to the non-enzymatic determination of this sugar. This reaction occurs by the reaction of glucose with a Cu(III) species, generally in an electrode forming an oxide coating. In this work, a reaction mechanism where the Cu(III) species generated are bound to the phosphate groups of the nanoparticles is proposed. The non-enzymatic glucose determination with these nanoparticles showed a good sensitivity, and the detection of concentration in the  $\mu\text{M}$  order. The-

refores, this work demonstrates for the first time the electrocatalytic applications of titanium phosphate nanoparticles. The different metals that can be introduced into these nanoparticles could allow the catalysis of other electrochemical reactions.

In summary, this PhD. Thesis has revealed in greater depth the electrochemical behavior of the surface of screen-printed carbon electrodes, widely used in the development of electrochemical biosensors. In addition, several electrochemical methods for detecting the size and concentration of quantum dots, its use as label for integrated and disposable biosensors, and its application to the localized generation of nanostructured surfaces are proposed. Finally, the electrochemical properties and the best titanium phosphate nanoparticles modified with electroactive metals were evaluated in order to use them as label for multiplexing biosensors and for electrocatalytic applications.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

---

En un trabajo tan extenso y con tantas ramificaciones es difícil de abarcar todas las posibilidades científicas que pueden presentar las herramientas/metodologías/técnicas utilizadas. Por esta razón, se describen, a continuación, diferentes posibilidades de trabajo futuro a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral:

- La técnica de Microscopía de celda electroquímica de barrido ha demostrado ser muy útil para la obtención de información fundamental sobre el comportamiento de electrodos serigrafiados. Este tipo de electrodos se utilizan de forma muy variable, por ejemplo, modificados con materiales nanoestructurados o activando su superficie con diferentes metodologías físicas, químicas o electroquímicas. Por tanto, esta técnica podría ser utilizada para el estudio de la actividad electroquímica localizada de electrodos serigrafiados modificados de diferentes maneras.
- Una tendencia en los últimos años es la caracterización de nanopartículas individuales, siendo muy interesantes los estudios de impacto electroquímico (colisiones de nanopartículas sobre la superficie de un electrodo), capaces de producir una reacción electroquímica relacionada con las propiedades de la nanopartícula. Tanto los quantum dots como las nanopartículas de fosfato de titanio podrían ser estudiadas de manera individual mediante estas técnicas. Por el alto sobrepotencial necesario para la reducción del metal de los quantum dots, se podría utilizar la electrodeposición selectiva de plata, ya que es un proceso que solamente ocurre cuando la nanopartícula está en una zona cercana a la superficie.
- En este sentido, la utilización de la electrodeposición selectiva de plata sobre quantum dots como un método para la detección de estas nanopartículas utilizadas como marca electroquímica es un paso evidente. Sin embargo, estudios iniciales han mostrado que la distancia presentada entre el electrodo y los quantum dots cuando se realiza un biosensor en su superficie no permite la reducción selectiva de plata. Este hecho sugiere que los quantum dots necesitan estar en contacto con la superficie

electrónica, lo que pone de manifiesto el mecanismo propuesto en esta Tesis Doctoral, donde los nanocristales aceptan electrones por excitación desde el electrodo y luego los transfieren a la plata que se encuentra en una zona cercana. Por tanto, la utilización de esta metodología en biosensores podría necesitar la presencia de una especie capaz de actuar como puente conductor de electrones entre el electrodo y los quantum dots. Este tipo de sistema podría ser evaluado en el futuro.

- Se ha descrito un comportamiento muy interesante del cobre en electrodos modificados con quantum dots. Una evaluación en mayor detalle de los procesos que ocurren podría ser un estudio fundamental muy interesante. Además, la magnificación de uno de los procesos anódicos como se observó, puede permitir su utilización como marca de biosensores utilizando la detección de este proceso amplificado.
- Aunque el objetivo del trabajo con las nanopartículas de fosfato de titanio era su evaluación como marca en biosensores desechables, se podría trabajar en mejorar los diseños de los sistemas propuestos con la minimización del número de etapas del procedimiento, además de otros estudios más completos como la estabilidad de los biosensores o estudios de especificidad frente a otros reactivos biológicos.
- La mejora de la estabilidad de las nanopartículas de fosfato de titanio en un medio acuoso sería un trabajo importante para la utilización de estas nanopartículas cuando están funcionalizadas con biomoléculas de interés.
- Por otro lado, se podría llevar a cabo un estudio directo para comparar las dos metodologías de funcionalización que se describen en la Tesis Doctoral. En este sentido, la mejora de la funcionalización de estas nanopartículas permitiendo obtener una mayor fracción de unión de la proteína mediante un enlace covalente en lugar de por interacciones electrostáticas, podría mejorar su rendimiento y estabilidad.
- En esta Tesis Doctoral se propone un mecanismo de reacción catalítica para la oxidación de glucosa en el que se sugiere que se forma Cu(III) estabilizado por la estructura particular de los grupos fosfato de la nanopartícula utilizada, siendo la especie responsable de la catálisis. Muy pocas especies de Cu(III) han sido descritas en la literatura ya que necesitan un ambiente muy estabilizador, por lo que el estudio de este proceso con técnicas más adecuadas que demostraran el mecanismo de esta reacción sería un trabajo muy interesante.

- La evaluación de muestras reales con los biosensores desarrollados en este trabajo sería un estudio interesante para comprobar su correcto funcionamiento con este tipo de muestras.



## FUTURE PERSPECTIVES

---

In such a vast and with so many ramifications work is difficult to cover all the scientific possibilities that may have the tools/methodologies/techniques used. For this reason, different possibilities for future work based on the results obtained in this PhD. Thesis are described below:

- The scanning electrochemical cell microscopy has been very useful for obtaining information on the behavior of screen-printed electrodes. Such electrodes are employed in a variety of configurations, such as modified with nanomaterials or activating its surface with different physical, chemical or electrochemical methods. Therefore, this technique could be used to study the localized electrochemical activity of modified screen-printed electrodes.
- A trend in recent years is the characterization of single nanoparticles, being very interesting the electrochemical impact studies (collision of nanoparticles on the electrode surface) capable of producing an electrochemical reaction related to the properties of the nanoparticle. Both quantum dots and titanium phosphate nanoparticles could be studied individually using these techniques. Due to the high overpotential required for reducing the metal on quantum dots, the selective electrodeposition of silver could be used, as it is a process that only occurs when the nanocrystal is near the electrode surface.
- In this regard, the use of the selective electrodeposition of silver on quantum dots as a method for the detection of these nanoparticles employed as electrochemical label is an obvious step. However, initial studies have shown that the distance between the electrode and the quantum dots, when a biosensor is performed on the surface, does not allow the selective reduction of silver. This fact suggests that the quantum dots need to be in contact with the electrode surface, to allow electron tunnelling as proposed in the mechanism here presented, where the nanocrystals accept electrons from the electrode and are, then, transferred to the silver. Therefore, the use of this

methodology in biosensors may require the presence of a species capable of acting as electron-conducting wire between the electrode and quantum dots.

- A quite special behavior of copper on quantum dots modified electrodes has been described in this work. A further fundamental study to understand this process could be very interesting. In addition, the amplification of one of the copper anodic processes could be used as detection label for biosensors.
- Although the main goal of the work with titanium phosphate nanoparticles was its evaluation as electrochemical label in disposable biosensors, some future work could be performed in order to improve the biosensing designs employed by minimizing the number of steps, in addition to other more comprehensive studies as the stability or specificity against other biological reagents.
- The improvement of the stability of titanium phosphate nanoparticles in aqueous medium would be an important work for the use of these nanoparticles when they are functionalized with biomolecules.
- A direct comparison of the two biofunctionalization methods of titanium phosphate nanoparticles could be carried out in order to analyze the biological function of both. In this regard, the improved functionalization of these nanoparticles with higher protein binding may improve the performance and stability.
- A catalytic reaction mechanism for the oxidation of glucose in presence of copper-modified titanium phosphate nanoparticles is proposed where a Cu(III) species is stabilized by the phosphate groups of the nanoparticle. A few Cu(III) species have been described in the literature as they need a very stabilizing environment, so the study of this process with most appropriate techniques to understand the mechanism of this reaction would be a very interesting work.
- The evaluation of the biosensors developed with real samples would complete the work and would evaluate the proper operation of the biosensors.

# APÉNDICES



## ALGUNOS ASPECTOS DE ELECTROQUÍMICA

---

En este apéndice se describen algunos aspectos interesantes de la Electroquímica que no se describen en el texto principal, pero a los que se hace algún tipo de referencia durante el mismo.

### A.1 LEYES DE FARADAY

Las reacciones electroquímicas que se producen en la interfase electrodo/disolución vienen determinadas por las leyes de Faraday de la electrólisis:

1. Las reacciones electroquímicas ocurren solamente en la superficie de un electrodo.
2. La masa de la especie transformada es directamente proporcional a la cantidad de carga eléctrica ( $Q$ ) transferida entre la especie redox y el electrodo (1ª ley de Faraday).
3. Para una cantidad dada de electricidad, la masa de la especie transformada en un electrodo es directamente proporcional al peso equivalente de la especie, es decir, proporcional a su peso atómico, pero inversamente proporcional a su valencia (2ª ley de Faraday).

Estas leyes resultan en la famosa ecuación de Faraday (ecuación A.1) que relaciona la carga transferida con la masa de la especie redox, donde  $n$  es el número de electrones transferidos,  $F$  es la constante de Faraday,  $m$  es la cantidad (en masa) de la especie que se transforma y  $M$  es la masa molar de esta especie.

$$Q = \frac{nFm}{M} \quad (\text{A.1})$$

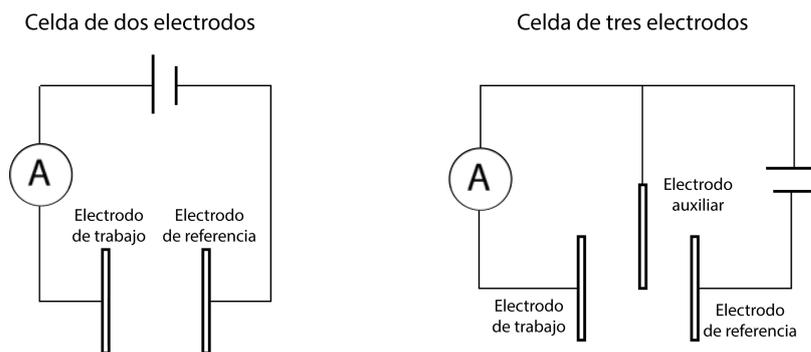


Figura A.1: Celdas electroquímicas de dos y tres electrodos.

## A.2 INSTRUMENTACIÓN ELECTROQUÍMICA

### *Celdas electroquímicas*

La electrólisis involucra una reacción electroquímica global que se compone de una reducción y una oxidación (semirreacciones), las cuales ocurren en dos electrodos diferentes: cátodo y ánodo, respectivamente. En un experimento típico solamente una de las reacciones es de interés, la que se produce en el electrodo de trabajo. Estas reacciones se producen por un flujo de corriente eléctrica en la interfase electrodo/disolución, y esta corriente eléctrica viene controlada por la diferencia de potenciales entre los electrodos. Existen dos diseños de celdas electroquímicas típicas: de dos electrodos y de tres electrodos (Figura A.1). Las celdas de dos electrodos se componen del electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, cuyo potencial es mantenido constante, y la diferencia de potenciales entre electrodos se produce cuando se varía el potencial del electrodo de trabajo. El principal problema de este tipo de celdas es que se produce una disminución en el potencial aplicado (caída óhmica) debido a que parte del potencial tiene que traspasar la resistencia de la disolución, y por tanto no es posible controlar adecuadamente el potencial del electrodo de trabajo.

Las celdas de tres electrodos se componen de electrodo de trabajo, referencia y auxiliar (o contraelectrodo). La utilización de un potenciostato para controlar estas celdas permite que la corriente electrolítica fluya entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, mientras que el potencial del electrodo de trabajo se controla en relación al electrodo de referencia, por el que no fluye corriente. Este hecho mejora la estabilidad experimental del electrodo de referencia utilizado. Además, la caída óhmica se minimiza, y el potencial aplicado

está más controlado. Sin embargo, la caída óhmica no se elimina por completo ya que la resistencia de la disolución puede afectar en algunos casos al potencial aplicado como se explica en el próximo apartado.

#### *Caída óhmica incompensada*

Como se ha descrito, la resistencia de la disolución en una celda electroquímica causa una disminución en la diferencia de potencial aplicado entre dos electrodos, llamada caída óhmica. Parte del potencial aplicado es requerido para traspasar esta resistencia, y según la ley de Ohm, también parte de la corriente se utiliza en este proceso ( $V = iR$ ). La magnitud de la caída óhmica depende del electrolito de fondo usado en la celda electroquímica y en la disposición de los electrodos. Una estrategia para minimizar la caída óhmica, según predice la ley de Ohm, es disminuir la corriente que fluye entre los electrodos o la resistencia de la disolución. Una corriente pequeña se puede obtener con electrodos de áreas pequeñas, y una resistencia menor se consigue mediante una mayor conductividad del medio o colocando los electrodos lo más cerca posible. En estos casos, una celda de dos electrodos puede ser utilizada ya que la caída óhmica es pequeña y no influye significativamente en la respuesta. Si la caída óhmica es elevada, una celda de tres electrodos es necesaria. En este caso, la corriente fluye entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, y por tanto, en el electrodo de referencia no fluye corriente, minimizando la caída óhmica entre este electrodo y el electrodo de trabajo. Incluso en este sistema la caída óhmica no puede ser eliminada por completa, ya que existe una resistencia incompensada en la celda ( $R_u$ ) debido a la distancia física entre el electrodo de referencia y de trabajo.

#### *Potenciostatos*

El instrumento que controla y registra las magnitudes eléctricas en una celda electroquímica de tres electrodos típica es el potenciostato. Este instrumento permite aplicar una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el referencia (y simultáneamente, medir la corriente que fluye en el electrodo de trabajo) o aplicar la corriente que fluye entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar y medir el cambio en la diferencia de potencial. El funcionamiento y los componentes eléctricos necesarios vienen descritos en el excelente libro de Bard y Faulkner<sup>195</sup>. Cabe destacar la variedad de potenciostatos comerciales disponibles, como por ejemplo, potenciostatos de laboratorio de tamaño

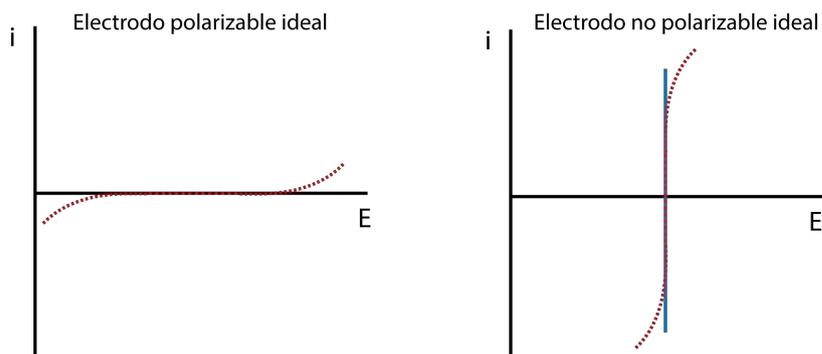


Figura A.2: Respuesta  $i$ - $E$  de un electrodo polarizable y no polarizable ideal.

convencional, más robustos, y con capacidad de realizar medidas simultáneas, ya sea en modo multicanal con varios electrodos de trabajo compartiendo electrodo de referencia y auxiliar, o en modo individual con varias celdas electroquímicas independientes. Por otro lado, también existen potenciostatos de pequeño tamaño, portátiles, que pueden ser conectados de manera inalámbrica al *software* de control con la posibilidad de realizar análisis *in situ*. Otra de las tendencias en los últimos años es el acoplamiento de potenciostatos con otro tipo de tecnología para conseguir equipos integrados, como por ejemplo, para la realización de medidas electroquimioluminiscentes o de espectroelectroquímica.

### A.3 ELECTRODOS POLARIZABLES

Un electrodo está polarizado cuando su potencial se varía de su potencial de equilibrio. Un electrodo puede comportarse como polarizable o no polarizable, dependiendo de su material y las posibles reacciones electroquímicas que pudiera sufrir. El potencial de un electrodo no polarizable se mantiene cercano al potencial de equilibrio, incluso si fluye una corriente a través de la celda, es decir un pequeño sobrepotencial causa un gran aumento en la corriente, como se observa en la [Figura A.2](#). Los electrodos de referencia que presentan un buen comportamiento suelen ser de este tipo, ya que mantienen un potencial constante durante el experimento. En un electrodo polarizable se necesita un elevado sobrepotencial para generar una corriente medible, hecho que les convierte en buenos electrodos de trabajo por la amplia ventana de potenciales disponible.

A.4 JAULA DE FARADAY

Una jaula de Faraday es un contenedor que se utiliza en experimentos de electroquímica con el objetivo de minimizar el ruido eléctrico externo que puede provenir de campos electromagnéticos externos. Esto se consigue por la repulsión electrostática de cargas iguales que causa una redistribución de cargas fuera de un material conductor, mientras que dentro del conductor el campo electrostático es cero. Por tanto una jaula de Faraday puede ser un contenedor dónde se coloca la celda electroquímica, y que, correctamente conectado (normalmente a la tierra del potencióstato, para que el potencial sea el mismo), evita la llegada de radiación electromagnética externa a la celda. La utilización de este dispositivo es muy importante cuando se estudian reacciones electroquímicas o se utiliza instrumentación que proporciona bajas corrientes eléctricas, normalmente por debajo de  $1 \mu\text{A}$ , o se necesitan determinar corrientes con gran precisión o experimentos a altas frecuencias de corriente alterna. Una jaula de Faraday muy sencilla puede construirse con una caja de cartón recubierta de papel de aluminio, siempre y cuando el papel de aluminio recubra de forma adecuada toda la caja, evitando en la medida de lo posible huecos en el recubrimiento.



# TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

---

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han ido utilizando diferentes técnicas de caracterización ya sea de nanomateriales o de superficies. A continuación se describen de manera muy breve y simplificada los fundamentos de las principales técnicas utilizadas:

## B.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

En la microscopía electrónica de barrido un haz de electrones se hace incidir sobre la superficie de una muestra e interacciona con sus átomos, produciendo varios tipos de respuesta, que proporcionan información sobre la topografía y composición de la superficie. El haz se barre a lo largo de toda la muestra y la respuesta detectada puede relacionarse con la posición para obtener una imagen de la superficie. La interacción de los electrones con la muestra no está confinada solamente a la superficie sino que puede llegar a zonas más profundas. La energía del haz incidente tiene un efecto determinante en la distancia de penetración de la muestra. En este sentido, en la [Figura B.1](#) se muestra la respuesta de la interacción del haz electrónico en función de la penetración del haz en la muestra, que puede ser desde pocos nm hasta 5  $\mu\text{m}$ . El intercambio energético entre el haz electrónico y la muestra puede resultar en las siguientes respuestas:

- generación de electrones Auger de la zona más externa de la superficie, muy útil para análisis químico superficial.
- emisión de electrones secundarios por dispersión inelásticas, que proporciona información topográfica de la superficie
- generación de electrones de alta energía por dispersión elástica (electrones retrodispersados), por la interacción con los núcleos atómicos. Un material más denso aumenta el número de electrones retrodispersados, reduciendo la interacción con regiones más profundas.

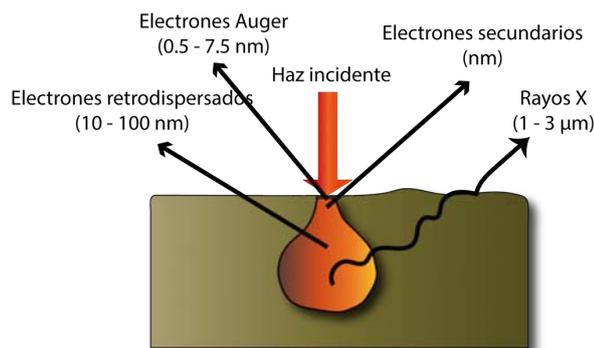


Figura B.1: Interacción del haz electrónico con la muestra y las diferentes respuestas producidas en función de la distancia de penetración del haz.

- emisión de radiación electromagnética (en forma de rayos X) desde las zonas más profundas de la interacción, útil para conocer la composición química de la muestra.

#### B.1.1 Espectroscopía de rayos x de energía dispersiva (EDX o EDS)

La espectroscopía de rayos X de energía dispersiva detecta rayos X generados tras la interacción de un haz de electrones con la muestra, capaz de excitar los electrones de los átomos superficiales, desde un nivel energético nuclear dejando una vacante en la capa energética interna. El átomo excitado vuelve a su estado fundamental mediante la recombinación de electrones de capas lejanas del núcleo de mayor energía hasta la posición vacante. La energía resultante puede ser emitida en forma de radiación de rayos-X. Las transiciones electrónicas de este estilo son muy complejas, y generalmente, son representativas de un átomo determinado, por lo que se puede determinar la composición química cuantitativa y cualitativa de la superficie analizada.

#### B.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

En la microscopía electrónica de transmisión una muestra formada por una película delgada es transiluminada por un haz de electrones (normalmente de mayor energía que en la SEM). Los electrones son desviados (por dispersión o difracción) por los átomos de la muestra hasta llegar al detector que forma la imagen de manera similar a una transparencia. La energía del haz electrónico determina la penetración de la muestra y la capacidad de generar más o menos eventos de dispersión, que afectan a la resolución

de la imagen obtenida. El análisis de los patrones de difracción pueden ser utilizados para obtener información sobre la estructura cristalina de la muestra. La TEM puede utilizarse en modo de barrido (STEM), aunque se obtiene una menor resolución, pero es posible realizar microanálisis con EDX para obtener información sobre la composición de la muestra.

### B.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV/VISIBLE)

La espectroscopía de absorción visible-ultravioleta es la espectroscopía de absorción molecular en esa región del espectro electromagnético. La interacción de la radiación electromagnética con especies químicas puede causar la excitación de un electrón del estado energético fundamental a un estado excitado, mediante la absorción de un fotón de luz. Esta absorción dependerá de los niveles energéticos de la especie, por lo que diferentes especies pueden absorber fotones de diferentes longitudes de onda. El espectro obtenido representa la luz absorbida (absorbancia) en función de la longitud de onda de la excitación, obteniendo bandas a cierta longitud de onda cuando la especie es capaz de absorber fotones de esa energía.

### B.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja es la espectroscopía de absorción molecular en esta región del espectro electromagnético. Las vibraciones y rotaciones de ciertas moléculas pueden causar la absorción de fotones de luz IR. El espectro se representa la absorción/transmisión en función de la longitud de onda de emisión (aunque es típico, su representación en función del número de onda ( $1/\text{longitud de onda}$ )).

### B.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA DE LÁSER CONFOCAL

La espectroscopía de fluorescencia involucra la excitación de electrones de una especie química mediante radiación electromagnética, normalmente en el rango visible/UV, para a continuación, tras la vuelta al estado fundamental de la especie (por el regreso del electrón del nivel superior al hueco del nivel inferior) emitir radiación, de menor energía (mayor longitud de onda) que la utilizada en la excitación. De la misma manera que para

los casos anteriores, se representa el espectro de fluorescencia en función de la longitud de onda.

La microscopía de láser confocal consiste en una configuración similar a un microscopio óptico, pero que se utiliza un haz láser para focalizar la excitación de luz en una pequeña zona de la muestra. Un divisor de haz separa la luz emitida de la luz fluorescente reflejada que es recogida en el detector, normalmente un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo. El microscopio confocal posee un colimador especial capaz de eliminar la luz desenfocada, resultando en imágenes fluorescentes de gran calidad. Esta técnica permite obtener imágenes de varios planos del eje Z de la muestra, y generar imágenes tridimensionales tras su combinación.

#### B.6 ESPECTROSCOPÍA RAMAN

La espectroscopía Raman proporciona información sobre vibraciones moleculares que pueden ser utilizadas para la identificación y cuantificación de muestras químicas. La técnica involucra un haz de luz monocromática (láser) sobre una muestra y la detección de la luz dispersada. La mayoría de esta luz tiene la misma frecuencia que la luz de excitación (dispersión elástica o Rayleigh). Una pequeña fracción de la luz dispersada se desplaza en energía de la luz incidente debido a interacciones del haz con los niveles energéticos vibracionales de las moléculas de la muestra (dispersión inelástica). Este desplazamiento proporciona información sobre transiciones vibraciones y rotacionales, que dependen de la composición química de la muestra. Un espectro Raman representa la intensidad en función de la frecuencia de la luz detectada (normalizando a 0 para la dispersión Rayleigh). La posición de la banda ofrece información cualitativa, mientras que la intensidad ofrece información cuantitativa. Como el haz de luz láser puede ser muy pequeño, la interacción con la muestra puede proporcionar una alta resolución espacial.

#### B.7 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que puede ser utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas pequeñas o moléculas en una suspensión líquida, típicamente del orden de nm hasta 1  $\mu\text{m}$ . El movimiento Browniano de las partículas en la suspensión causa la dispersión de la luz láser incidente a diferentes

intensidades. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad de la dispersión conduce a la obtención de la velocidad del movimiento browniano, que depende del tamaño de las partículas según la relación de Stokes-Einstein ( $\mu = 1/6\pi\eta r$ ), donde  $\eta$  es la viscosidad del fluido.

#### B.8 POTENCIAL $\zeta$

El potencial  $\zeta$  determina la diferencia de potencial entre el seno de la disolución y una capa estacionara de fluido conectada a una partícula dispersada, similar a la doble capa eléctrica que se produce en la interfase electrodo/disolución, y específicamente al límite que se encuentra en la capa difusa de las partículas.

Su valor se utiliza para estimar la estabilidad de dispersiones coloidales, ya que indica el grado de repulsión electrostática entre partículas cargadas adyacentes en una dispersión. Un valor alto (en términos absolutos, ya que puede ser positivo o negativo) es significativo de estabilidad (partículas evitan la agregación). Cuando el potencial es pequeño, las fuerzas atractivas pueden exceder esa repulsión y la dispersión puede flocular. Valores mayores de +30 y -30 mV se consideran normalmente estables (aunque eventualmente puedan aglomerarse con el tiempo).

#### B.9 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)

La espectroscopía XPS es una técnica que puede proporcionar información sobre la composición elemental, fórmula empírica, estado químico y estado electrónico de elementos en zonas superficiales de una muestra. Se utiliza un haz de rayos X monocromático para la excitación del material que libera fotoelectrones de la superficie del material (entre 1-5 nm), cuya energía cinética y número son detectados. Cada átomo de una muestra tiene energías de enlace características de sus electrones de capas internas, que tiene una alta dependencia del ambiente química en el que se encuentran los átomos (estados de oxidación, geometría, etc.). Esta técnica se basa en el famoso efecto fotoeléctrico descubierto experimentalmente por H. Hertz en 1887 y descrito teóricamente por Albert Einstein, algo que le valió la obtención del Premio Nobel de Física en 1921.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] J. Wang, B. Tian "Screen-printed stripping voltammetric/potentiometric electrodes for decentralized testing of trace lead" *Anal. Chem.* 64(15) (1992) 1706–1709 (Citado en la pag [2](#).)
- [2] C. S. Lim, S. M. Tan, Z. Sofer, M. Pumera "Impact Electrochemistry of Layered Transition Metal Dichalcogenides" *ACS Nano* 9(8) (2015) 8474–8483 (Citado en la pag [2](#).)
- [3] M. Giovanni, A. Ambrosi, Z. Sofer, M. Pumera "Impact electrochemistry of individual molybdenum nanoparticles" *Electrochem. commun.* 56 (2015) 16–19 (Citado en la pag [2](#).)
- [4] N. González-Diéguez, A. Colina, J. López-Palacios, A. Heras "Spectroelectrochemistry at Screen-Printed Electrodes: Determination of Dopamine" *Anal. Chem.* 84(21) (2012) 9146–9153 (Citado en la pag [2](#).)
- [5] D. Hernández-Santos, M. Díaz-González, M. B. González-García, A. Costa-García "Enzymatic Genosensor on Streptavidin-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes" *Anal. Chem.* 76(23) (2004) 6887–6893 (Citado en la pag [2](#).)
- [6] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García "Alkaline phosphatase-catalyzed silver deposition for electrochemical detection" *Anal. Chem.* 79(14) (2007) 5272–5277 (Citado en la pag [2](#).)
- [7] M. M. P. S. Neves, M. B. González-García, H. P. A. Nouws, A. Costa-García "Celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on nanohybrid screen-printed carbon electrodes." *Biosens. Bioelectron.* 31(1) (2012) 95–100 (Citado en las pags [2](#), [34](#), [47](#) y [203](#).)
- [8] M. M. P. S. Neves, M. B. González-García, H. P. a. Nouws, A. Costa-García "An electrochemical deamidated gliadin antibody immunosensor for celiac disease clinical diagnosis." *Analyst* 138(7) (2013) 1956–8 (Citado en las pags [2](#) y [47](#).)

- 
- [9] M. M. P. S. Neves, M. B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado "Screen-Printed Electrochemical 96-Well Plate : a High- Throughput Platform for Multiple Analytical Applications" *Electroanalysis* 26 (2014) 2764–2772 (Citado en las pags 4 y 190.)
- [10] W. Y. Su, S. M. Wang, S. H. Cheng "Electrochemically pretreated screen-printed carbon electrodes for the simultaneous determination of aminophenol isomers" *J. Electroanal. Chem.* 651(2) (2011) 166–172 (Citado en las pags 8 y 185.)
- [11] A. P. Washe, P. Lozano-Sánchez, D. Bejarano-Nosas, I. Katakis "Facile and versatile approaches to enhancing electrochemical performance of screen printed electrodes" *Electrochim. Acta* 91 (2013) 166–172 (Citado en las pags 8, 12 y 185.)
- [12] C. Martin, C. Grgicak "The Effect of Repeated Activation on Screen-Printed Carbon Electrode Cards" *ECS Trans.* 61(26) (2014) 1–8 (Citado en las pags 8 y 186.)
- [13] G. Gritzner *Handbook of Reference Electrodes* (2013) ISBN 978-3-642-36187-6 (Citado en la pag 8.)
- [14] P. T. Lee, D. Lowinsohn, R. G. Compton "The use of screen-printed electrodes in a proof of concept electrochemical estimation of homocysteine and glutathione in the presence of Cysteine using catechol" *Sensors (Switzerland)* 14(6) (2014) 10395–10411 (Citado en las pags 9 y 257.)
- [15] O. Domínguez-Renedo, M. Alonso-Lomillo, M. Arcos-Martínez "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications" *Talanta* 73(2) (2007) 202–219 (Citado en la pag 9.)
- [16] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani "Screen-printed electrodes for bio-sensing: a review (2008-2013)" *Microchim. Acta* 181(9-10) (2014) 865–891 (Citado en la pag 9.)
- [17] F. Ghamouss, P.-Y. Tessier, M. Djouadi, M.-P. Besland, M. Boujtita "Examination of the electrochemical reactivity of screen printed carbon electrode treated by radio-frequency argon plasma" *Electrochem. commun.* 9(7) (2007) 1798–1804 (Citado en la pag 10.)

- 
- [18] F. Ghamouss, E. Luais, C. Thobie-Gautier, P.-Y. Tessier, M. Boujtita "Argon plasma treatment to enhance the electrochemical reactivity of screen-printed carbon surfaces" *Electrochim. Acta* 54(11) (2009) 3026–3032 (Citado en la pag 10.)
- [19] R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks "Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms" *Sensors Actuators, B Chem.* 138(2) (2009) 556–562 (Citado en las pags 10, 11 y 12.)
- [20] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, L. Angnes "Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks" *Electrochim. Acta* 43(23) (1998) 3459–3465 (Citado en las pags 10 y 11.)
- [21] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García "Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes" *Electrochim. Acta* 53(10) (2007) 3635–3642 (Citado en las pags 10 y 12.)
- [22] U. Bilitewski, G. Chemnitz, P. Rüger, R. Schmid "Miniaturized disposable biosensors" *Sens. Actuators B* 7(1-3) (1992) 351–355 (Citado en la pag 10.)
- [23] H. D. Goldberg, R. B. Brown, D. P. Liu, M. E. Meyerhoff "Screen printing: a technology for the batch fabrication of integrated chemical-sensor arrays" *Sens. Actuators B* 21(3) (1994) 171–183 (Citado en la pag 10.)
- [24] L. Mooring, N. G. Karousos, C. Livingstone, J. Davis, G. G. Wildgoose, S. J. Wilkins, R. G. Compton "Evaluation of a novel pad printing technique for the fabrication of disposable electrode assemblies" *Sens. Actuators B* 107(2) (2005) 491–496 (Citado en la pag 10.)
- [25] G. Cui, S. J. Kim, S. H. Choi, H. Nam, G. S. Cha, K. J. Paeng "A disposable amperometric sensor screen printed on a nitrocellulose strip: A glucose biosensor employing lead oxide as an interference-removing agent" *Anal. Chem.* 72(8) (2000) 1925–1929 (Citado en la pag 10.)
- [26] C. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret "Glucose biosensor strip in a three electrode configuration based on composite and biocomposite materials applied by planar thick film technology" *Sens. Actuators B* 52(3) (1998) 257–263 (Citado en la pag 11.)

- [27] R. L. McCreery "Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry" *Chem. Rev.* 108(7) (2008) 2646–2687 (Citado en la pag 11.)
- [28] K. Z. Brainina, A. M. Bond "Characterization of Thick-Layer Graphite Disposable Voltammetric Electrodes" *Anal. Chem.* 67(15) (1995) 2586–2591 (Citado en la pag 11.)
- [29] N. A. Choudry, D. K. Kampouris, R. O. Kadara, C. E. Banks "Disposable highly ordered pyrolytic graphite-like electrodes: Tailoring the electrochemical reactivity of screen printed electrodes" *Electrochem. commun.* 12(1) (2010) 6–9 (Citado en las pags 11, 12, 144 y 145.)
- [30] S. Wang, K. Chang, C. Yuan "Enhancement of electrochemical properties of screen-printed carbon electrodes by oxygen plasma treatment" *Electrochim. Acta* 54(21) (2009) 4937–4943 (Citado en las pags 12, 146 y 151.)
- [31] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification" *Pure Appl. Chem* 71(12) (1999) 2333–2348 (Citado en la pag 14.)
- [32] D. Thévenot, K. Toth, R. R. Durst, G. G. Wilson, D. Thevenot "Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification" *Biosens. Bioelectron.* 16(12) (2001) 121–131 (Citado en la pag 14.)
- [33] A. Cayuela, M. L. Soriano, M. Valcárcel "Reusable sensor based on functionalized carbon dots for the detection of silver nanoparticles in cosmetics via inner filter effect" *Anal. Chim. Acta* 872 (2015) 70–76 (Citado en la pag 14.)
- [34] C.-Y. Ko, J.-H. Huang, S. Raina, W. P. Kang "A high performance non-enzymatic glucose sensor based on nickel hydroxide modified nitrogen-incorporated nanodiamonds." *Analyst* 138(11) (2013) 3201–8 (Citado en la pag 14.)
- [35] L. C. Clark, C. Lyons "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102(1) (1962) 29–45 (Citado en la pag 15.)
- [36] L. C. Clark JR., R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor "Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography" *J. Appl Physiol.* (1953) 189–193 (Citado en la pag 15.)
- [37] J. N. Miller, J. C. Miller *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (2010) ISBN 9780273730422 (Citado en las pags 17 y 138.)

- [38] D. Leech "Affinity biosensors" *Chem. Soc. Rev.* 23(3) (1994) 205 (Citado en la pag 20.)
- [39] K. M. Song, S. Lee, C. Ban "Aptamers and their biological applications" *Sensors* 12(1) (2012) 612–631 (Citado en la pag 22.)
- [40] A. Warsinke, A. Benkert, F. Scheller "Electrochemical Immunoassays" *Fresen. J. Anal. Chem.* 366 (2000) 622–634 (Citado en la pag 22.)
- [41] A. Sadana "Influence of Diffusional Limitations and Reaction Order on Antigen-Antibody Binding Kinetics" in "Eng. Biosens.", ISBN 978-0-12-613763-7 (2002) 23–44 (Citado en la pag 24.)
- [42] A. Ruffien, M. Dequaire, P. Brossier "Covalent immobilization of oligonucleotides on p-aminophenyl-modified carbon screen-printed electrodes for viral DNA sensing." *Chem. Commun. (Camb).* 2(7) (2003) 912–3 (Citado en la pag 25.)
- [43] P. Skládal "Advances in Electrochemical Immunosensors" *Electroanalysis* 9(10) (1997) 737–745 (Citado en la pag 27.)
- [44] J. Wang *Analytical Electrochemistry* volume 3 (2000) ISBN 0471282723 (Citado en la pag 30.)
- [45] N. J. Ronkainen-Matsuno, J. H. Thomas, H. B. Halsall, W. R. Heineman "Electrochemical immunoassay moving into the fast lane" *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21(4) (2002) 213–225 (Citado en la pag 31.)
- [46] T. Bryan, X. Luo, P. R. Bueno, J. J. Davis "An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood" *Biosens. Bioelectron.* 39(1) (2013) 94–98 (Citado en la pag 31.)
- [47] C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson "Capacitive biosensors" *Electroanalysis* 13(3) (2001) 173–180 (Citado en la pag 32.)
- [48] E. C. Rama, M. B. González-García, A. Costa-García "Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured Screen-Printed Carbon Electrodes" *Sens. Actuators B* 201 (2014) 567–571 (Citado en la pag 33.)
- [49] R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, R. C. B. Marques, M. B. González-García, M. B. P. Oliveira, C. Delerue-Matos "Detection of Ara h 1 (a major peanut

- allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor." *Biosens. Bioelectron.* 64C (2014) 19–24 (Citado en las pags 33 y 196.)
- [50] V. Escamilla-Gómez, D. Hernández-Santos, M. B. González-García, J. M. Pingarrón-Carrazón, A. Costa-García "Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor." *Biosens. Bioelectron.* 24(8) (2009) 2678–83 (Citado en la pag 34.)
- [51] R. García-González, A. Costa-García, M. T. Fernández-Abedul "Methylene blue covalently attached to single stranded DNA as electroactive label for potential bioassays" *Sens. Actuators B* 191 (2014) 784–790 (Citado en la pag 34.)
- [52] G. Martínez-Paredes, M. B. González-García, A. Costa-García "Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers" *Sens. Actuators B* 149(2) (2010) 329–335 (Citado en la pag 34.)
- [53] S. Campuzano, R. M. Torrente-Rodríguez, E. López-Hernández, F. Conzuelo, R. Granados, J. M. Sánchez-Puelles, J. M. Pingarrón "Magnetobiosensors Based on Viral Protein p19 for MicroRNA Determination in Cancer Cells and Tissues" *Angew. Chemie Int. Ed.* 53(24) (2014) 6168–6171 (Citado en la pag 34.)
- [54] A. de la Escosura-Muñiz, A. Mekoçi "Nanoparticle based enhancement of electrochemical DNA hybridization signal using nanoporous electrodes." *Chem. Commun. (Camb).* 46(47) (2010) 9007–9 (Citado en la pag 34.)
- [55] A. de la Escosura-Muñiz, M. Espinoza-Castañeda, M. Hasegawa, L. Philippe, A. Mekoçi "Nanoparticles-based nanochannels assembled on a plastic flexible substrate for label-free immunosensing" *Nano Res.* 8(4) (2014) 1180–1188 (Citado en la pag 34.)
- [56] M. Fojta, L. Havran, J. Fulnečková, T. Kubičárová "Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators" *Electroanalysis* 12(12) (2000) 926–934 (Citado en la pag 34.)
- [57] M. M. P. da Silva Neves, M. B. G. García, D. H. Santos, P. Fanjul-Bolado "Hydroquinone diphosphate/Ag<sup>+</sup> as an enzymatic substrate for alkaline phosphatase catalyzed silver deposition" *Electrochem. commun.* 60 (2015) 1–4 (Citado en la pag 36.)

- 
- [58] A. S. Bommarius, M. F. Paye "Stabilizing biocatalysts." *Chem. Soc. Rev.* 42(15) (2013) 6534–65 (Citado en la pag 36.)
- [59] M. B. González-García, C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García "Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin-biotin interaction" *Biosens. Bioelectron.* 15(5-6) (2000) 315–321 (Citado en las pags 37 y 42.)
- [60] X. Yu, B. Munge, V. Patel, G. Jensen, A. Bhirde, J. D. Gong, S. N. Kim, J. Gillespie, J. S. Gutkind, F. Papadimitrakopoulos, J. F. Rusling "Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers" *J. Am. Chem. Soc.* 128(34) (2006) 11199–11205 (Citado en la pag 40.)
- [61] O. Veiseh, J. W. Gunn, M. Zhang "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62(3) (2010) 284–304 (Citado en la pag 40.)
- [62] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz "Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology." *Chem. Rev.* 113(3) (2013) 1904–2074 (Citado en la pag 41.)
- [63] C. S. S. R. Kumar *Biofunctionalization of Nanomaterials* (2005) ISBN 978-3-527-31381-5 (Citado en la pag 41.)
- [64] J. Biscay, M. B. G. García, A. C. García "Electrochemical biotin determination based on a screen printed carbon electrode array and magnetic beads" *Sens. Actuators B* 205 (2014) 426–432 (Citado en las pags 42 y 193.)
- [65] S. V. Kergaravat, G. A. Gómez, S. N. Fabiano, T. I. Laube Chávez, M. I. Pividori, S. R. Hernández "Biotin determination in food supplements by an electrochemical magneto biosensor" *Talanta* 97 (2012) 484–490 (Citado en las pags 42 y 193.)
- [66] D. Du, J. Ding, Y. Tao, H. Li, X. Chen "CdTe nanocrystal-based electrochemical biosensor for the recognition of neutravidin by anodic stripping voltammetry at electrodeposited bismuth film." *Biosens. Bioelectron.* 24(4) (2008) 869–74 (Citado en la pag 42.)

- [67] M. Neves, M. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado "Streptavidin functionalized nickel nanowires: A new ferromagnetic platform for biotinylated-based assays" *Talanta* 144 (2015) 283–288 (Citado en la pag 43.)
- [68] Ministerio de Sanidad y Consumo "Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca" Technical report (2008) (Citado en las pags 43 y 44.)
- [69] National Institute for Health and Care Excellence "Coeliac disease: recognition, assessment and management" Technical report (2015) (Citado en las pags 43 y 44.)
- [70] S. Husby, S. Koletzko, I. R. Korponay-Szabó, M. L. Mearin, A. Phillips, R. Shamir, R. Troncone, K. Giersiepen, D. Branski, C. Catassi, M. Leigeman, M. Mäki, C. Ribes-Koninckx, A. Ventura, K. P. Zimmer "European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease." *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 54(1) (2012) 136–60 (Citado en la pag 45.)
- [71] T. Balkenhohl, F. Lisdat "Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera." *Anal. Chim. Acta* 597(1) (2007) 50–7 (Citado en las pags 45 y 212.)
- [72] M. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, S. Alegret, M. del Valle "Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease." *Anal. Biochem.* 388(2) (2009) 229–34 (Citado en las pags 46 y 213.)
- [73] S. Dulay, P. Lozano-Sánchez, E. Iwuoha, I. Katakis, C. K. O'Sullivan "Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry." *Biosens. Bioelectron.* 26(9) (2011) 3852–3856 (Citado en las pags 46, 203 y 213.)
- [74] M. Giannetto, M. Mattarozzi, E. Umiltà, A. Manfredi, S. Quaglia, M. Careri "An amperometric immunosensor for diagnosis of celiac disease based on covalent immobilization of open conformation tissue transglutaminase for determination of anti-tTG antibodies in human serum." *Biosens. Bioelectron.* 62C (2014) 325–330 (Citado en las pags 46 y 212.)
- [75] A. Manfredi, M. Mattarozzi, M. Giannetto, M. Careri "Piezoelectric immunosensor based on antibody recognition of immobilized open-tissue transglutaminase: An innovative perspective on diagnostic devices for celiac disease" *Sens. Actuators B* 201 (2014) 300–307 (Citado en la pag 46.)

- [76] G. Adornetto, G. Volpe, A. De Stefano, S. Martini, G. Gallucci, A. Manzoni, S. Bernardini, M. Mascini, D. Moscone "An ELIME assay for the rapid diagnosis of coeliac disease." *Anal. Bioanal. Chem.* 403(4) (2012) 1191–4 (Citado en las pags 46 y 213.)
- [77] S. V. Kergaravat, L. Beltramino, N. Garnerero, L. Trotta, M. Wagener, M. Isabel Pividori, S. R. Hernandez "Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease." *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 203–9 (Citado en las pags 47 y 213.)
- [78] H. B. Habtamu, M. Sentic, M. Silvestrini, L. De Leo, T. Not, S. Arbault, D. Manojlovic, N. Sojic, P. Ugo "A Sensitive Electrochemiluminescence Immunosensor for Celiac Disease Diagnosis Based on Nanoelectrode Ensembles" *Anal. Chem.* 87(24) (2015) 12080–12087 (Citado en la pag 47.)
- [79] M. Pereira da Silva Neves, M. B. González-García, C. Delerue-Matos, A. Costa-García "Nanohybrid Materials as Transducer Surfaces for Electrochemical Sensing Applications" *Electroanalysis* 23(1) (2011) 63–71 (Citado en las pags 47, 52 y 183.)
- [80] M. M. Neves, M. B. González-García, A. Santos-Silva, A. Costa-García "Voltammetric immunosensor for the diagnosis of celiac disease based on the quantification of anti-gliadin antibodies" *Sens. Actuators B* 163(1) (2012) 253–259 (Citado en la pag 47.)
- [81] L. C. Rosales-Rivera, J. L. Acero-Sánchez, P. Lozano-Sánchez, I. Katakis, C. K. O'Sullivan "Electrochemical immunosensor detection of antigliadin antibodies from real human serum." *Biosens. Bioelectron.* 26(11) (2011) 4471–6 (Citado en la pag 47.)
- [82] L. Mleczko, G. Lolli "Carbon nanotubes: An example of multiscale development - A mechanistic view from the subnanometer to the meter scale" *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52(36) (2013) 9372–9387 (Citado en la pag 49.)
- [83] S. N. Kim, J. F. Rusling, F. Papadimitrakopoulos "Carbon nanotubes for electronic and electrochemical detection of biomolecules" *Adv. Mater.* 19(20) (2007) 3214–3228 (Citado en la pag 49.)
- [84] C. N. R. Rao, a. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, a. Govindaraj "Graphene: the new two-dimensional nanomaterial." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48(42) (2009) 7752–77 (Citado en la pag 49.)

- [85] K. Novoselov, A. Geim, S. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. Dubonos, I. Grigorieva, A. Firsov "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films" *Science* (80-. ). 306(2004) (2011) 666 (Citado en la pag 49.)
- [86] A. G. Güell, N. Ebejer, M. E. Snowden, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Structural correlations in heterogeneous electron transfer at monolayer and multilayer graphene electrodes." *J. Am. Chem. Soc.* 134(17) (2012) 7258–61 (Citado en las pags 49 y 112.)
- [87] A. G. Güell, A. S. Cuharuc, Y.-r. Kim, G. Zhang, S.-y. Tan, N. Ebejer, P. R. Unwin "Redox-Dependent Spatially Resolved Electrochemistry at Graphene and Graphite Step Edges" *ACS Nano* 9(4) (2015) 3558–3571 (Citado en las pags 49 y 112.)
- [88] E. B. Bahadir, M. K. Sezgintürk "Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing" *TrAC Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 1–14 (Citado en la pag 49.)
- [89] A. Sánchez Calvo, C. Botas, D. Martín-Yerga, P. Álvarez, R. Menéndez, A. Costa-García "Comparative Study of Screen-Printed Electrodes Modified with Graphene Oxides Reduced by a Constant Current" *J. Electrochem. Soc.* 162(10) (2015) B282–B290 (Citado en las pags 49 y 154.)
- [90] M. Hilder, B. Winther-Jensen, D. Li, M. Forsyth, D. R. MacFarlane "Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions." *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13(20) (2011) 9187–93 (Citado en la pag 49.)
- [91] A. P. Alivisatos "Nanocrystals: Building blocks for modern materials design" *Endeavour* 21(2) (1997) 56–60 (Citado en la pag 49.)
- [92] D. Martín-Yerga, M. B. González-García, A. Costa-García "Use of nanohybrid materials as electrochemical transducers for mercury sensors" *Sens. Actuators, B* 165(1) (2012) 143–150 (Citado en las pags 52 y 263.)
- [93] G. Martínez-Paredes, M. B. González-García, A. Costa-García "In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition" *Electrochim. Acta* 54(21) (2009) 4801–4808 (Citado en las pags 53 y 264.)
- [94] M.-Y. Lee, J. Peng, C.-C. Wu "Geometric effect of copper nanoparticles electrodeposited on screen-printed carbon electrodes on the detection of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -amino acids" *Sens. Actuators B* 186 (2013) 270–277 (Citado en la pag 53.)

- [95] R. Sonnenfeld, B. C. Schardt "Tunneling microscopy in an electrochemical cell: Images of Ag plating" *Appl. Phys. Lett.* 49(18) (1986) 1172–1174 (Citado en la pag 53.)
- [96] R. T. Potzschke, C. A. Gervasi, S. Vinzelberg, G. Staikov, W. J. Lorenz "Nanoscale studies of Ag electrodeposition on HOPG (0001)" *Electrochim. Acta* 40(10) (1995) 1469–1474 (Citado en la pag 53.)
- [97] J. V. Zoval, J. Lee, S. Gorer, R. M. Penner "Electrochemical Preparation of Platinum Nanocrystallites with Size Selectivity on Basal Plane Oriented Graphite Surfaces" *J. Phys. Chem. B* 5647(97) (1998) 1166–1175 (Citado en la pag 53.)
- [98] S. C. S. Lai, R. A. Lazenby, P. M. Kirkman, P. R. Unwin "Nucleation, aggregative growth and detachment of metal nanoparticles during electrodeposition at electrode surfaces" *Chem. Sci.* 6(2) (2015) 1126–1138 (Citado en las pags 53, 112 y 215.)
- [99] T. J. Davies, C. E. Banks, R. G. Compton "Voltammetry at spatially heterogeneous electrodes" *J. Solid State Electrochem.* 9(12) (2005) 797–808 (Citado en las pags 54 y 55.)
- [100] C. E. Banks, T. J. Davies, G. G. Wildgoose, R. G. Compton "Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites." *Chem. Commun. (Camb.)* (7) (2005) 829–841 (Citado en la pag 55.)
- [101] S. E. F. Kleijn, S. C. S. Lai, M. T. M. Koper, P. R. Unwin "Electrochemistry of nanoparticles." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53(14) (2014) 3558–86 (Citado en las pags 55 y 58.)
- [102] K. R. Ward, M. Gara, N. S. Lawrence, R. S. Hartshorne, R. G. Compton "Nanoparticle modified electrodes can show an apparent increase in electrode kinetics due solely to altered surface geometry: The effective electrochemical rate constant for non-flat and non-uniform electrode surfaces" *J. Electroanal. Chem.* 695 (2013) 1–9 (Citado en la pag 58.)
- [103] V. R. Stamenkovic, B. Fowler, B. S. Mun, G. Wang, P. N. Ross, C. A. Lucas, N. M. Markovic "Improved Oxygen Reduction Activity on Pt<sub>3</sub>Ni(111) via Increased Surface Site Availability" *Science* (80-. ). 315(5811) (2007) 493–497 (Citado en la pag 58.)
- [104] J. Wang "Electrochemical glucose biosensors." *Chem. Rev.* 108(2) (2008) 814–25 (Citado en la pag 58.)

- [105] C. M. Welch, C. E. Banks, A. O. Simm, R. G. Compton "Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide" *Anal. Bioanal. Chem.* 382(1) (2005) 12–21 (Citado en las pags 59 y 295.)
- [106] F. W. Campbell, S. R. Belding, R. Baron, L. Xiao, R. G. Compton "Hydrogen peroxide electroreduction at a silver-nanoparticle array: Investigating nanoparticle size and coverage effects" *J. Phys. Chem. C* 113(21) (2009) 9053–9062 (Citado en las pags 59 y 295.)
- [107] R. Wilson, A. P. F. Turner "Glucose oxidase: an ideal enzyme" *Biosens. Bioelectron.* 7(3) (1992) 165–185 (Citado en la pag 59.)
- [108] A. Ekimov, A. Onushchenko "Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals" *ZhETF Pis ma Redaktsiiu* 34(6) (1981) 363–366 (Citado en la pag 61.)
- [109] W. C. Chan, S. Nie "Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection" *Science* (80-. ). 281(5385) (1998) 2016–2018 (Citado en la pag 61.)
- [110] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos "Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels" *Science* (80-. ). 281(5385) (1998) 2013–2016 (Citado en la pag 61.)
- [111] A. P. Alivisatos "Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots" *Science* (80-. ). 271(5251) (1996) 933–937 (Citado en las pags 61 y 64.)
- [112] P. Reiss, M. Protiere, L. Li "Core/Shell Semiconductor Nanocrystals" *Small* 5(2) (2009) 154–168 (Citado en la pag 61.)
- [113] H. Weller "Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules" *Angew. Chem., Int. Ed.* 32(1) (1993) 41–53 (Citado en la pag 62.)
- [114] M. A. El-Sayed "Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals" *Acc. Chem. Res.* 37(5) (2004) 326–333 (Citado en la pag 62.)

- [115] L. E. Brus "A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites" *J. Chem. Phys.* 79(11) (1983) 5566 (Citado en las pags 62 y 67.)
- [116] J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel "The use of luminescent quantum dots for optical sensing" *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25(3) (2006) 207–218 (Citado en la pag 63.)
- [117] J. Tang, R. A. Marcus "Mechanisms of fluorescence blinking in semiconductor nanocrystal quantum dots" *J. Chem. Phys.* 123(5) (2005) 054704 (Citado en la pag 63.)
- [118] M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus "Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals" *Nature* 383(6603) (1996) 802–804 (Citado en la pag 63.)
- [119] L. Manna, E. C. Scher, A. P. Alivisatos "Synthesis of soluble and processable rod-, arrow-, teardrop-, and tetrapod-shaped CdSe nanocrystals" *J. Am. Chem. Soc.* 122(51) (2000) 12700–12706 (Citado en la pag 63.)
- [120] Z. A. Peng, X. Peng "Mechanisms of the Shape Evolution of CdSe Nanocrystals" *J. Am. Chem. Soc.* 123(7) (2001) 1389–1395 (Citado en las pags 63 y 128.)
- [121] W. W. Yu, Y. A. Wang, X. Peng "Formation and Stability of Size-, Shape-, and Structure-Controlled CdTe Nanocrystals: Ligand Effects on Monomers and Nanocrystals" *Chem. Mater.* 15(22) (2003) 4300–4308 (Citado en la pag 63.)
- [122] M. V. Llopis, J. C. C. Rodríguez, F. J. F. Martín, A. M. Coto-García, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel "Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications." *Nanotechnology* 22(38) (2011) 385703 (Citado en la pag 63.)
- [123] J. Shi, Y. Zhu, X. Zhang, W. R. Baeyens, A. M. García-Campaña "Recent developments in nanomaterial optical sensors" *TrAC Trends Anal. Chem.* 23(5) (2004) 351–360 (Citado en la pag 63.)
- [124] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites" *J. Am. Chem. Soc.* 115(19) (1993) 8706–8715 (Citado en la pag 64.)

- [125] A. L. Rogach, D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig, N. A. Kotov "Raisin Bun-Type Composite Spheres of Silica and Semiconductor Nanocrystals" *Chem. Mater.* 12(9) (2000) 2676–2685 (Citado en la pag 64.)
- [126] J. Zhu, O. Palchik, S. Chen, A. Gedanken "Microwave Assisted Preparation of CdSe, PbSe, and Cu<sub>2-x</sub>Se Nanoparticles" *J. Phys. Chem. B* 104(31) (2000) 7344–7347 (Citado en la pag 64.)
- [127] M. Amelia, C. Lincheneau, S. Silvi, A. Credi "Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots." *Chem. Soc. Rev.* 41(17) (2012) 5728–43 (Citado en las pags 65, 67 y 216.)
- [128] A. Franceschetti, A. Zunger "Pseudopotential calculations of electron and hole addition spectra of InAs, InP, and Si quantum dots" *Phys. Rev. B* 62(4) (2000) 2614–2623 (Citado en la pag 65.)
- [129] S. K. Haram, B. M. Quinn, A. J. Bard "Electrochemistry of CdS nanoparticles: a correlation between optical and electrochemical band gaps." *J. Am. Chem. Soc.* 123(36) (2001) 8860–1 (Citado en las pags 67, 216 y 219.)
- [130] S. K. Haram, A. Kshirsagar, Y. D. Gujarathi, P. P. Ingole, O. a. Nene, G. B. Markad, S. P. . Nanavati "Quantum Confinement in CdTe Quantum Dots: Investigation through Cyclic Voltammetry Supported by Density Functional Theory (DFT)" *J. Phys. Chem. C* 115(14) (2011) 6243–6249 (Citado en la pag 67.)
- [131] M. Amelia, S. Impellizzeri, S. Monaco, I. Yildiz, S. Silvi, F. M. Raymo, A. Credi "Structural and size effects on the spectroscopic and redox properties of CdSe nanocrystals in solution: the role of defect states." *Chemphyschem* 12(12) (2011) 2280–8 (Citado en la pag 67.)
- [132] E. Kuçur, W. Bücking, T. Nann "Electrochemical determination of mesoscopic phenomena, defect states in CdSe nanocrystals and charge carrier manipulability" *Microchim. Acta* 160(3) (2008) 299–308 (Citado en la pag 67.)
- [133] E. Kuçur, W. Bücking, R. Giernoth, T. Nann "Determination of Defect States in Semiconductor Nanocrystals by Cyclic Voltammetry" *J. Phys. Chem. B* 109(43) (2005) 20355–20360 (Citado en la pag 67.)

- [134] S. Impellizzeri, S. Monaco, I. Yildiz, M. Amelia, A. Credi, F. M. Raymo "Structural Implications on the Electrochemical and Spectroscopic Signature of CdSe-ZnS Core-Shell Quantum Dots" *J. Phys. Chem. C* 114(15) (2010) 7007–7013 (Citado en la pag 67.)
- [135] S. K. Poznyak, N. P. Osipovich, A. Shavel, D. V. Talapin, M. Gao, A. Eychmüller, N. Gaponik "Size-dependent electrochemical behavior of thiol-capped CdTe nanocrystals in aqueous solution." *J. Phys. Chem. B* 109(3) (2005) 1094–100 (Citado en la pag 67.)
- [136] D. Hynek, K. Tmejova, V. Milosavljevic, A. Moulick, P. Kopel, V. Adam, R. Kizek "Electrochemical Characterization of Various Synthesized Quantum Dots and the Effect of Aging and Storage Way" *Int. J. Electrochem. Sci.* 10 (2015) 1117–1127 (Citado en la pag 68.)
- [137] C. Wang, M. Shim, P. Guyot-Sionnest "Electrochromic Nanocrystal Quantum Dots" *Science* (80-. ). 291(5512) (2001) 2390–2392 (Citado en la pag 68.)
- [138] P. Guyot-Sionnest, C. Wang "Fast Voltammetric and Electrochromic Response of Semiconductor Nanocrystal Thin Films" *J. Phys. Chem. B* 107(30) (2003) 7355–7359 (Citado en la pag 68.)
- [139] C. Galland, Y. Ghosh, A. Steinbrück, M. Sykora, J. a. Hollingsworth, V. I. Klimov, H. Htoon "Two types of luminescence blinking revealed by spectroelectrochemistry of single quantum dots" *Nature* 479(7372) (2011) 203–207 (Citado en la pag 68.)
- [140] P. P. Jha, P. Guyot-Sionnest "Trion Decay in Colloidal Quantum Dots" *ACS Nano* 3(4) (2009) 1011–1015 (Citado en la pag 68.)
- [141] Z. Ding, B. M. Quinn, S. K. Haram, L. E. Pell, B. A. Korgel, A. J. Bard "Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots" *Science* (80-. ). 296(5571) (2002) 1293–1297 (Citado en la pag 68.)
- [142] N. Myung, Z. Ding, A. J. Bard "Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe Nanocrystals" *Nano Lett.* 2(11) (2002) 1315–1319 (Citado en la pag 68.)
- [143] Y.-Y. Zhang, H. Zhou, P. Wu, H.-R. Zhang, J.-J. Xu, H.-Y. Chen "In Situ Activation of CdS Electrochemiluminescence Film and Its Application in H<sub>2</sub>S Detection" *Anal. Chem.* 86(17) (2014) 8657–8664 (Citado en la pag 68.)

- [144] N. Myung, Y. Bae, A. J. Bard "Effect of Surface Passivation on the Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe/ZnSe Nanocrystals" *Nano Lett.* 3(8) (2003) 1053–1055 (Citado en la pag 68.)
- [145] J. Lei, H. Ju "Fundamentals and bioanalytical applications of functional quantum dots as electrogenerated emitters of chemiluminescence" *TrAC Trends Anal. Chem.* 30(8) (2011) 1351–1359 (Citado en la pag 68.)
- [146] W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen "Photoelectrochemical bioanalysis: the state of the art" *Chem. Soc. Rev.* 44(3) (2015) 729–741 (Citado en la pag 69.)
- [147] H. O. Finklea "Photoelectrochemistry: Introductory concepts" *J. Chem. Educ.* 60(4) (1983) 325 (Citado en la pag 69.)
- [148] G. Jie, J. Zhang, D. Wang, C. Cheng, H.-Y. Chen, J.-J. Zhu "Electrochemiluminescence Immunosensor Based on CdSe Nanocomposites" *Anal. Chem.* 80(11) (2008) 4033–4039 (Citado en la pag 70.)
- [149] D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller "Highly Luminescent Monodisperse CdSe and CdSe/ZnS Nanocrystals Synthesized in a Hexadecylamine-Trioctylphosphine Oxide-Trioctylphosphine Mixture" *Nano Lett.* 1(4) (2001) 207–211 (Citado en la pag 70.)
- [150] K. Pinwattana, J. Wang, C.-T. Lin, H. Wu, D. Du, Y. Lin, O. Chailapakul "CdSe/ZnS quantum dots based electrochemical immunoassay for the detection of phosphorylated bovine serum albumin." *Biosens. Bioelectron.* 26(3) (2010) 1109–13 (Citado en la pag 71.)
- [151] J. Wang, G. Liu, R. Polsky, A. Merkoçi "Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags" *Electrochem. Commun.* 4(9) (2002) 722–726 (Citado en la pag 71.)
- [152] J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi "Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets." *J. Am. Chem. Soc.* 125(11) (2003) 3214–5 (Citado en las pags 71 y 173.)
- [153] J. A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, G. Collins "Quantum-dot/aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor." *J. Am. Chem. Soc.* 128(7) (2006) 2228–9 (Citado en la pag 71.)

- [154] S. Marín, A. Merkoçi "Direct electrochemical stripping detection of cystic-fibrosis-related DNA linked through cadmium sulfide quantum dots." *Nanotechnology* 20(5) (2009) 055101 (Citado en las pags 71 y 180.)
- [155] C. Kokkinos, A. Economou, P. S. Petrou, S. E. Kakabakos "Microfabricated Tin-Film Electrodes for Protein and DNA Sensing Based on Stripping Voltammetric Detection of Cd(II) Released from Quantum Dots Labels." *Anal. Chem.* 85(22) (2013) 10686–91 (Citado en la pag 71.)
- [156] G. Liu, J. Wang, J. Kim, M. R. Jan, G. E. Collins "Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins." *Anal. Chem.* 76(23) (2004) 7126–30 (Citado en la pag 71.)
- [157] R. Thüerer, T. Vigassy, M. Hirayama, J. Wang, E. Bakker, E. Pretsch "Potentiometric immunoassay with quantum dot labels." *Anal. Chem.* 79(13) (2007) 5107–10 (Citado en la pag 72.)
- [158] H. Wu, G. Liu, J. Wang, Y. Lin "Quantum-dots based electrochemical immunoassay of interleukin-1 $\alpha$ " *Electrochem. Commun.* 9(7) (2007) 1573–1577 (Citado en la pag 72.)
- [159] J. Wang, G. Liu, H. Wu, Y. Lin "Quantum-dot-based electrochemical immunoassay for high-throughput screening of the prostate-specific antigen." *Small* 4(1) (2008) 82–6 (Citado en la pag 72.)
- [160] M. Freitas, S. Viswanathan, H. P. A. Nouws, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos "Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella typhimurium*" *Biosens. Bioelectron.* 51 (2014) 195–200 (Citado en la pag 72.)
- [161] G. Jie, J. Zhang, G. Jie, L. Wang "A novel quantum dot nanocluster as versatile probe for electrochemiluminescence and electrochemical assays of DNA and cancer cells." *Biosens. Bioelectron.* 52C (2013) 69–75 (Citado en la pag 72.)
- [162] N. V. Beloglazova, P. S. Shmelin, E. S. Speranskaya, B. Lucas, C. Helmbrecht, D. Knopp, R. Niessner, S. De Saeger, I. Y. Goryacheva "Quantum dot loaded liposomes as fluorescent labels for immunoassay." *Anal. Chem.* 85(15) (2013) 7197–204 (Citado en la pag 72.)

- [163] K. Chen, L. Y. Chou, F. Song, W. C. Chan "Fabrication of metal nanoshell quantum-dot barcodes for biomolecular detection" *Nano Today* 8(3) (2013) 228–234 (Citado en la pag 72.)
- [164] X. Li, W. Li, Q. Yang, X. Gong, W. Guo, C. Dong, J. Liu, L. Xuan, J. Chang "Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip." *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6(9) (2014) 6406–14 (Citado en la pag 72.)
- [165] G. Liu, Y.-Y. Lin, J. Wang, H. Wu, C. M. Wai, Y. Lin "Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip." *Anal. Chem.* 79(20) (2007) 7644–53 (Citado en la pag 72.)
- [166] D. E. De Vos, M. Dams, B. F. Sels, P. a. Jacobs "Ordered Mesoporous and Microporous Molecular Sieves Functionalized with Transition Metal Complexes as Catalysts for Selective Organic Transformations" *Chem. Rev.* 102(10) (2002) 3615–3640 (Citado en la pag 73.)
- [167] S. M. Patel, U. V. Chudasama, P. A. Ganeshpure "Ketalization of ketones with diols catalyzed by metal(IV) phosphates as solid acid catalysts" *J. Mol. Catal. A Chem.* 194(1-2) (2003) 267–271 (Citado en la pag 73.)
- [168] T. V. Kovalchuk, H. Sfihi, A. S. Korchev, A. S. Kovalenko, V. G. Il'in, V. N. Zaitsev, J. Fraissard "Synthesis, Structure, and Acidic Properties of MCM-41 Functionalized with Phosphate and Titanium Phosphate Groups" *J. Phys. Chem. B* 109(29) (2005) 13948–13956 (Citado en la pag 73.)
- [169] Y. Jin, Y. Shen, T. Hibino "Proton conduction in metal pyrophosphates ( $MP_2O_7$ ) at intermediate temperatures" *J. Mater. Chem.* 20(30) (2010) 6214 (Citado en la pag 73.)
- [170] Y.-Z. Zheng, M. Evangelisti, R. E. P. Winpenny "Co-Gd phosphonate complexes as magnetic refrigerants" *Chem. Sci.* 2(1) (2011) 99–102 (Citado en la pag 73.)
- [171] Y. Wu, Z. Wen, J. Li "Hierarchical Carbon-Coated  $LiFePO_4$  Nanoplate Microspheres with High Electrochemical Performance for Li-Ion Batteries" *Adv. Mater.* 23(9) (2011) 1126–1129 (Citado en la pag 73.)

- [172] S. M. Patel, U. V. Chudasama, P. A. Ganeshpure "Cyclodehydration of 1,4-butanediol catalyzed by metal(IV) phosphates" *React. Kinet. Catal. Lett.* 76(2) (2002) 317–325 (Citado en la pag 73.)
- [173] J. Liu, J. Zhang, S. Cheng, Z. Liu, B. Han "DNA-mediated synthesis of microporous single-crystal-like  $\text{NaTi}_2(\text{PO}_4)_3$  nanospheres." *Small* 4(11) (2008) 1976–9 (Citado en la pag 73.)
- [174] S. Sebti, M. Zahouily, H. Lazrek, J. Mayoral, D. Macquarrie "Phosphates: New Generation of Liquid-Phase Heterogeneous Catalysts in Organic Chemistry" *Curr. Org. Chem.* 12(3) (2008) 203–232 (Citado en la pag 73.)
- [175] K. Jia, B. Pan, L. Lv, Q. Zhang, X. Wang, B. Pan, W. Zhang "Impregnating titanium phosphate nanoparticles onto a porous cation exchanger for enhanced lead removal from waters." (2009) (Citado en la pag 73.)
- [176] K. Jia, B. Pan, Q. Zhang, W. Zhang, P. Jiang, C. Hong, B. Pan, Q. Zhang "Adsorption of  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$  from waters by amorphous titanium phosphate." *J. Colloid Interface Sci.* 318(2) (2008) 160–6 (Citado en las pags 73 y 300.)
- [177] B. B. Sahu, K. Parida "Cation Exchange and Sorption Properties of Crystalline  $\alpha$ -Titanium(IV) Phosphate" *J. Colloid Interface Sci.* 248(2) (2002) 221–230 (Citado en la pag 73.)
- [178] A. Bhaumik "Mesoporous titanium phosphates and related molecular sieves: Synthesis, characterization and applications" *J. Chem. Sci.* 114(4) (2002) 451–460 (Citado en la pag 73.)
- [179] M. P. Kapoor, S. Inagaki, H. Yoshida "Novel Zirconium-Titanium Phosphates Mesoporous Materials for Hydrogen Production by Photoinduced Water Splitting" *J. Phys. Chem. B* 109(19) (2005) 9231–9238 (Citado en la pag 73.)
- [180] R. Murugavel, A. Choudhury, M. G. Walawalkar, R. Pothiraja, C. N. R. Rao "Metal Complexes of Organophosphate Esters and Open-Framework Metal Phosphates: Synthesis, Structure, Transformations, and Applications" *Chem. Rev.* 108(9) (2008) 3549–3655 (Citado en la pag 73.)

- [181] T.-Z. Ren, Z.-Y. Yuan, A. Azioune, J.-J. Pireaux, B.-L. Su "Tailoring the porous hierarchy of titanium phosphates." *Langmuir* 22(8) (2006) 3886–94 (Citado en la pag 73.)
- [182] A. Dutta, A. K. Patra, S. Dutta, B. Saha, A. Bhaumik "Hierarchically porous titanium phosphate nanoparticles: an efficient solid acid catalyst for microwave assisted conversion of biomass and carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural" *J. Mater. Chem.* 22(28) (2012) 14094 (Citado en la pag 73.)
- [183] S. Ekambaram, S. C. Sevov "Organically Templated Mixed-Valent TiIII/TiIV Phosphate with an Octahedral- Tetrahedral Open Framework" *Angew. Chemie Int. Ed.* 38(3) (1999) 372–375 (Citado en la pag 73.)
- [184] Q. Wang, L. Zhong, J. Sun, J. Shen "A Facile Layer-by-Layer Adsorption and Reaction Method to the Preparation of Titanium Phosphate Ultrathin Films" *Chem. Mater.* 17(13) (2005) 3563–3569 (Citado en la pag 73.)
- [185] a. Bhaumik, S. Inagaki "Mesoporous titanium phosphate molecular sieves with ion-exchange capacity." *J. Am. Chem. Soc.* 123(4) (2001) 691–6 (Citado en la pag 73.)
- [186] Z. Yin, Y. Sakamoto, J. Yu, S. Sun, O. Terasaki, R. Xu "Microemulsion-based synthesis of titanium phosphate nanotubes via amine extraction system." *J. Am. Chem. Soc.* 126(29) (2004) 8882–3 (Citado en la pag 73.)
- [187] J. Zhang, Z. Ma, J. Jiao, H. Yin, W. Yan, E. W. Hagaman, J. Yu, S. Dai "Layer-by Layer Grafting of Titanium Phosphate onto Mesoporous Silica SBA-15 Surfaces: Synthesis, Characterization, and Applications" *Langmuir* 25(21) (2009) 12541–12549 (Citado en la pag 73.)
- [188] J. Liu, X. Wei, Y. Yu, J. Song, X. Wang, A. Li, X.-W. Liu, W.-Q. Deng "Uniform core-shell titanium phosphate nanospheres with orderly open nanopores: a highly active Brønsted acid catalyst." *Chem. Commun. (Camb)*. 46(10) (2010) 1670–2 (Citado en las pags 73, 74, 131, 239 y 241.)
- [189] L.-N. Feng, Z.-P. Bian, J. Peng, F. Jiang, G.-H. Yang, Y.-D. Zhu, D. Yang, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu "Ultrasensitive multianalyte electrochemical immunoassay based on metal ion functionalized titanium phosphate nanospheres." *Anal. Chem.* 84(18) (2012) 7810–5 (Citado en las pags 74 y 239.)

- [190] L.-N. Feng, J. Peng, Y.-D. Zhu, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu "Synthesis of Cd(2+)-functionalized titanium phosphate nanoparticles and application as labels for electrochemical immunoassays." *Chem. Commun. (Camb)*. 48(37) (2012) 4474–6 (Citado en las pags [74](#), [133](#), [239](#) y [242](#).)
- [191] F.-f. Cheng, T.-t. He, H.-t. Miao, J.-j. Shi, L.-p. Jiang, J.-j. Zhu "Electron Transfer Mediated Electrochemical Biosensor for MicroRNAs Detection Based on Metal Ion Functionalized Titanium Phosphate Nanospheres at Attomole Level" *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7(4) (2015) 2979–2985 (Citado en las pags [74](#), [135](#), [239](#) y [282](#).)
- [192] J. Peng, L.-N. Feng, Z.-J. Ren, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu "Synthesis of silver nanoparticle-hollow titanium phosphate sphere hybrid as a label for ultrasensitive electrochemical detection of human interleukin-6." *Small* 7(20) (2011) 2921–8 (Citado en la pag [75](#).)
- [193] G. Liu, H. Wu, J. Wang, Y. Lin "Apoferitin-templated synthesis of metal phosphate nanoparticle labels for electrochemical immunoassay." *Small* 2(10) (2006) 1139–43 (Citado en la pag [75](#).)
- [194] G. Liu, H. Wu, A. Dohnalkova, Y. Lin "Apoferitin-templated synthesis of encoded metallic phosphate nanoparticle tags." *Anal. Chem.* 79(15) (2007) 5614–9 (Citado en la pag [75](#).)
- [195] A. J. Bard, L. R. Faulkner *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications* (2001) ISBN 0471043729 (Citado en las pags [93](#) y [335](#).)
- [196] A. J. Bard, F. R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev "Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles" *Anal. Chem.* 61(2) (1989) 132–138 (Citado en la pag [106](#).)
- [197] A. J. Bard, M. V. Mirkin *Scanning Electrochemical Microscopy* (2012) ISBN 9781439831137 (Citado en la pag [107](#).)
- [198] K. McKelvey, M. E. Snowden, M. Peruffo, P. R. Unwin "Quantitative visualization of molecular transport through porous membranes: Enhanced resolution and contrast using intermittent contact-scanning electrochemical microscopy" *Anal. Chem.* 83(17) (2011) 6447–6454 (Citado en la pag [108](#).)
- [199] H. V. Patten, K. E. Meadows, L. a. Hutton, J. G. Iacobini, D. Battistel, K. McKelvey, A. W. Colburn, M. E. Newton, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Electrochemical map-

- ping reveals direct correlation between heterogeneous electron-transfer kinetics and local density of states in diamond electrodes." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51(28) (2012) 7002–6 (Citado en la pag [108](#).)
- [200] C.-C. Chen, Y. Zhou, L. a. Baker "Scanning Ion Conductance Microscopy" *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5(1) (2012) 207–228 (Citado en la pag [108](#).)
- [201] C. G. Williams, M. A. Edwards, A. L. Colley, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Scanning Micropipet Contact Method for High-Resolution Imaging of Electrode Surface Redox Activity" *Anal. Chem.* 81(7) (2009) 2486–2495 (Citado en la pag [108](#).)
- [202] N. Ebejer, M. Schnippering, A. W. Colburn, M. a. Edwards, P. R. Unwin "Localized high resolution electrochemistry and multifunctional imaging: Scanning electrochemical cell microscopy" *Anal. Chem.* 82(22) (2010) 9141–9145 (Citado en la pag [108](#).)
- [203] M. E. Snowden, A. G. Güell, S. C. S. Lai, K. McKelvey, N. Ebejer, M. A. O'Connell, A. W. Colburn, P. R. Unwin "Scanning Electrochemical Cell Microscopy: Theory and Experiment for Quantitative High Resolution Spatially-Resolved Voltammetry and Simultaneous Ion-Conductance Measurements" *Anal. Chem.* 84(5) (2012) 2483–2491 (Citado en las pags [108](#) y [143](#).)
- [204] R. L. McCreery, M. T. McDermott "Comment on electrochemical kinetics at ordered graphite electrodes" *Anal. Chem.* 84(5) (2012) 2602–2605 (Citado en la pag [112](#).)
- [205] S. C. S. Lai, A. N. Patel, K. McKelvey, P. R. Unwin "Definitive evidence for fast electron transfer at pristine basal plane graphite from high-resolution electrochemical imaging." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51(22) (2012) 5405–8 (Citado en la pag [112](#).)
- [206] A. N. Patel, M. G. Collignon, M. a. O'Connell, W. O. Y. Hung, K. McKelvey, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "A new view of electrochemistry at highly oriented pyrolytic graphite." *J. Am. Chem. Soc.* 134(49) (2012) 20117–30 (Citado en las pags [112](#) y [145](#).)
- [207] A. N. Patel, K. McKelvey, P. R. Unwin "Nanoscale electrochemical patterning reveals the active sites for catechol oxidation at graphite surfaces" *J. Am. Chem. Soc.* 134(50) (2012) 20246–20249 (Citado en la pag [112](#).)

- [208] S. C. S. Lai, P. V. Dudin, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Visualizing zeptomole (electro)catalysis at single nanoparticles within an ensemble." *J. Am. Chem. Soc.* 133(28) (2011) 10744–7 (Citado en la pag [112.](#))
- [209] S. E. F. Kleijn, S. C. S. Lai, T. S. Miller, A. I. Yanson, M. T. M. Koper, P. R. Unwin "Landing and catalytic characterization of individual nanoparticles on electrode surfaces." *J. Am. Chem. Soc.* 134(45) (2012) 18558–61 (Citado en la pag [112.](#))
- [210] M. Kang, D. Perry, Y.-R. Kim, A. W. Colburn, R. a. Lazenby, P. R. Unwin "Time-Resolved Detection and Analysis of Single Nanoparticle Electrocatalytic Impacts" *J. Am. Chem. Soc.* 137(34) (2015) 10902–10905 (Citado en la pag [112.](#))
- [211] B. D. B. Aaronson, C.-H. Chen, H. Li, M. T. M. Koper, S. C. S. Lai, P. R. Unwin "Pseudo-single-crystal electrochemistry on polycrystalline electrodes: visualizing activity at grains and grain boundaries on platinum for the Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> redox reaction." *J. Am. Chem. Soc.* 135(10) (2013) 3873–80 (Citado en la pag [112.](#))
- [212] A. G. Güell, N. Ebejer, M. E. Snowden, K. McKelvey, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Quantitative nanoscale visualization of heterogeneous electron transfer rates in 2D carbon nanotube networks." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(29) (2012) 11487–92 (Citado en la pag [112.](#))
- [213] A. G. Güell, K. E. Meadows, P. V. Dudin, N. Ebejer, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Mapping Nanoscale Electrochemistry of Individual Single-Walled Carbon Nanotubes" *Nano Lett.* 14(1) (2014) 220–224 (Citado en la pag [112.](#))
- [214] J. C. Byers, A. G. Güell, P. R. Unwin "Nanoscale Electrocatalysis: Visualizing Oxygen Reduction at Pristine, Kinked, and Oxidized Sites on Individual Carbon Nanotubes" *J. Am. Chem. Soc.* 136(32) (2014) 11252–11255 (Citado en la pag [112.](#))
- [215] Y. Shao, M. V. Mirkin "Voltammetry at micropipet electrodes." *Anal. Chem.* 70(15) (1998) 3155–3161 (Citado en la pag [118.](#))
- [216] R. Barlag, F. Nyasulu, R. Starr "A Student-Made Silver-Silver Chloride Reference Electrode for the General Chemistry Laboratory: 10 min Preparation" *J. Chem. Educ.* 91 (2014) 766–768 (Citado en la pag [121.](#))

- [217] P. Fanjul-Bolado, P. Queipo, P. J. Lamas-Ardisana, A. Costa-García "Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools" *Talanta* 74(3) (2007) 427–33 (Citado en la pag [126](#).)
- [218] Z. A. Peng, X. Peng "Nearly Monodisperse and Shape-Controlled CdSe Nanocrystals via Alternative Routes: Nucleation and Growth" *J. Am. Chem. Soc.* 124(13) (2002) 3343–3353 (Citado en las pags [126](#) y [128](#).)
- [219] M. T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R. A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J.-M. Mallet, J.-C. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W. J. Parak "Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobos." *Nano Lett.* 7(9) (2007) 2613–7 (Citado en la pag [128](#).)
- [220] A. R. Montoro Bustos, J. R. Encinar, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel "Elemental mass spectrometry: a powerful tool for an accurate characterisation at elemental level of quantum dots." *Chem. Commun.* (Cambridge, U. K.) (21) (2009) 3107–9 (Citado en las pags [128](#), [161](#), [188](#) y [256](#).)
- [221] J. Ustarroz, U. Gupta, A. Hubin, S. Bals, H. Terryn "Electrodeposition of Ag nanoparticles onto carbon coated TEM grids - A direct approach to study early stages of nucleation" *Electrochem. commun.* 12(12) (2010) 1706–1709 (Citado en la pag [129](#).)
- [222] B. Scharifker, G. Hills "Theoretical and experimental studies of multiple nucleation" *Electrochim. Acta* 28(7) (1983) 879–889 (Citado en las pags [130](#) y [228](#).)
- [223] G. T. Hermanson *Bioconjugate Techniques* ISBN 9780123705013 (Citado en la pag [135](#).)
- [224] Y. Wang, D. C. Alsmeyer, R. L. McCreery "Raman spectroscopy of carbon materials: structural basis of observed spectra" *Chem. Mater.* 2(5) (1990) 557–563 (Citado en la pag [143](#).)
- [225] K. Ray, R. L. McCreery "Spatially resolved Raman spectroscopy of carbon electrode surfaces: Observations of structural and chemical heterogeneity" *Anal. Chem.* 69(22) (1997) 4680–4687 (Citado en la pag [143](#).)
- [226] J. P. Metters, R. O. Kadara, C. E. Banks "New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments" *Analyst* 136(6) (2011) 1067 (Citado en la pag [144](#).)

- [227] K. Prasad, J.-C. Chen, C. Ay, J.-M. Zen "Mediatorless catalytic oxidation of NADH at a disposable electrochemical sensor" *Sens. Actuators B* 123(2) (2007) 715–719 (Citado en la pag 145.)
- [228] J. Ghilane, F. Hauquier, J. C. Lacroix "Oxidative and stepwise grafting of dopamine inner-sphere redox couple onto electrode material: Electron transfer activation of dopamine" *Anal. Chem.* 85 (2013) 11593–11601 (Citado en la pag 145.)
- [229] A. N. Patel, S.-y. Tan, T. S. Miller, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Comparison and reappraisal of carbon electrodes for the voltammetric detection of dopamine." *Anal. Chem.* 85(24) (2013) 11755–64 (Citado en las pags 145, 146 y 155.)
- [230] K. L. Adams, B. K. Jena, S. J. Percival, B. Zhang "Highly Sensitive Detection of Exocytotic Dopamine Release Using a Gold-Nanoparticle-Network Microelectrode" *Anal. Chem.* 83(3) (2011) 920–927 (Citado en la pag 146.)
- [231] S. P. E, T. S. Miller, J. V. Macpherson, P. R. Unwin "Controlled functionalisation of single-walled carbon nanotube network electrodes for the enhanced voltammetric detection of dopamine" *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(39) (2015) 26394–26402 (Citado en la pag 146.)
- [232] S. H. DuVall, R. L. McCreery "Control of Catechol and Hydroquinone Electron-Transfer Kinetics on Native and Modified Glassy Carbon Electrodes" *Anal. Chem.* 71(20) (1999) 4594–4602 (Citado en la pag 146.)
- [233] B. D. Bath, D. J. Michael, B. J. Trafton, J. D. Joseph, P. L. Runnels, R. M. Wightman "Subsecond adsorption and desorption of dopamine at carbon-fiber microelectrodes" *Anal. Chem.* 72(24) (2000) 5994–6002 (Citado en la pag 146.)
- [234] S. Alwarappan, K. S. A. Butcher, D. K. Y. Wong "Evaluation of hydrogenated physically small carbon electrodes in resisting fouling during voltammetric detection of dopamine" *Sensors Actuators, B Chem.* 128(1) (2007) 299–305 (Citado en la pag 146.)
- [235] Y. Li, M. Liu, C. Xiang, Q. Xie, S. Yao "Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions" *Thin Solid Films* 497(1-2) (2006) 270–278 (Citado en la pag 146.)

- [236] P. Majzlíková, J. Prášek, M. Eliáš, O. Jašek, J. Pekárek, J. Hubálek, L. Zajíčková "Comparison of different modifications of screen-printed working electrodes of electrochemical sensors using carbon nanotubes and plasma treatment" *Phys. Status Solidi* 211(12) (2014) 2756–2764 (Citado en la pag [146](#).)
- [237] I. Apetrei, C. Apetrei "Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Electrodes for Detection of Catecholamines" *IEEE Sens. J.* 15(6) (2015) 3094–3101 (Citado en la pag [146](#).)
- [238] K. Sudhakara Prasad, G. Muthuraman, J. M. Zen "The role of oxygen functionalities and edge plane sites on screen-printed carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid" *Electrochem. commun.* 10(4) (2008) 559–563 (Citado en la pag [151](#).)
- [239] A. Economou "Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis" *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24(4) (2005) 334–340 (Citado en la pag [162](#).)
- [240] V. Mirceski, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, R. Gulaboski, I. Drangov "Diagnostics of Anodic Stripping Mechanisms under Square-Wave Voltammetry Conditions Using Bismuth Film Substrates." *Anal. Chem.* 84(10) (2012) 4429–36 (Citado en las pags [162](#) y [163](#).)
- [241] V. Mirceski, B. Sebez, M. Jancovska, B. Ogorevc, S. B. Hocevar "Mechanisms and kinetics of electrode processes at bismuth and antimony film and bare glassy carbon surfaces under square-wave anodic stripping voltammetry conditions" *Electrochim. Acta* 105 (2013) 254–260 (Citado en la pag [163](#).)
- [242] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng "Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals" *Chem. Mater.* 15(14) (2003) 2854–2860 (Citado en las pags [163](#) y [176](#).)
- [243] R. T. Kachoosangi, C. E. Banks, X. Ji, R. G. Compton "Electroanalytical determination of cadmium(II) and lead(II) using an in-situ bismuth film modified edge plane pyrolytic graphite electrode." *Anal. Sci.* 23(3) (2007) 283–9 (Citado en la pag [167](#).)
- [244] N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban "Stripping analysis of heavy metals in tap water using the bismuth film electrode." *Anal. Bioanal. Chem.* 396(3) (2010) 1365–9 (Citado en la pag [167](#).)

- [245] N. Serrano, J. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban "Ex situ Deposited Bismuth Film on Screen-Printed Carbon Electrode: A Disposable Device for Stripping Voltammetry of Heavy Metal Ions" *Electroanalysis* 22(13) (2010) 1460–1467 (Citado en la pag 168.)
- [246] N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban "Coating methods, modifiers and applications of bismuth screen-printed electrodes" *TrAC Trends Anal. Chem.* (Citado en la pag 168.)
- [247] S. Dal Borgo, V. Jovanovski, B. Pihlar, S. B. Hocevar "Operation of bismuth film electrode in more acidic medium" *Electrochim. Acta* 155 (2015) 196–200 (Citado en la pag 171.)
- [248] A. Merkoçi, L. H. Marcolino-Junior, S. Marín, O. Fatibello-Filho, S. Alegret "Detection of cadmium sulphide nanoparticles by using screen-printed electrodes and a handheld device." *Nanotechnology* 18(3) (2007) 035502 (Citado en las pag 174 y 234.)
- [249] N. Chaisuwan, H. Xu, G. Wu, J. Liu "A highly sensitive differential pulse anodic stripping voltammetry for determination of 17 $\beta$ -estradiol (E2) using CdSe quantum dots based on indirect competitive immunoassay." *Biosens. Bioelectron.* 46 (2013) 150–4 (Citado en la pag 179.)
- [250] D. Tang, L. Hou, R. Niessner, M. Xu, Z. Gao, D. Knopp "Multiplexed electrochemical immunoassay of biomarkers using metal sulfide quantum dot nanolabels and trifunctionalized magnetic beads." *Biosens. Bioelectron.* 46 (2013) 37–43 (Citado en la pag 179.)
- [251] M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García "Carbon nanotubes (CNTs)-based electroanalysis" *Anal. Bioanal. Chem.* 390(1) (2008) 293–298 (Citado en la pag 183.)
- [252] E. Tesarova, L. Baldrianova, S. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc "Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode" *Electrochim. Acta* 54(5) (2009) 1506–1510 (Citado en la pag 183.)
- [253] W. J. Yi, Y. Li, G. Ran, H. Q. Luo, N. B. Li "Determination of cadmium(II) by square wave anodic stripping voltammetry using bismuth-antimony film electrode" *Sens. Actuators, B* 166-167(Li) (2012) 544–548 (Citado en la pag 184.)

- [254] M. Drozd, M. Pietrzak, E. Malinowska "Studies on voltammetric determination of cadmium in samples containing native and digested proteins" *Anal. Chim. Acta* 819 (2014) 65–70 (Citado en la pag [188](#).)
- [255] J. D. Wright, K. M. Rawson, W. O. Ho, D. Athey, C. J. McNeil "Specific binding assay for biotin based on enzyme channelling with direct electron transfer electrochemical detection using horseradish peroxidase" *Biosens. Bioelectron.* 10(5) (1995) 495–500 (Citado en la pag [193](#).)
- [256] J.-A. A. Ho, W.-L. Hsu, W.-C. Liao, J.-K. Chiu, M.-L. Chen, H.-C. Chang, C.-C. Li "Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid." *Biosens. Bioelectron.* 26(3) (2010) 1021–7 (Citado en la pag [193](#).)
- [257] J. Biscay, M. B. González García, A. Costa García "Electrochemical biotin detection based on magnetic beads and a new magnetic flow cell for screen printed electrode" *Talanta* 131 (2014) 706–711 (Citado en la pag [193](#).)
- [258] S. Patris, P. De Pauw, M. Vandeput, J. Huet, P. Van Antwerpen, S. Muyldermans, J.-M. Kauffmann "Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination." *Talanta* 130 (2014) 164–70 (Citado en la pag [196](#).)
- [259] D. Du, Z. Zou, Y. Shin, J. Wang, H. Wu, M. H. Engelhard, J. Liu, I. A. Aksay, Y. Lin "Sensitive immunosensor for cancer biomarker based on dual signal amplification strategy of graphene sheets and multienzyme functionalized carbon nanospheres." *Anal. Chem.* 82(7) (2010) 2989–95 (Citado en la pag [196](#).)
- [260] H. V. Tran, B. Piro, S. Reisberg, L. Huy Nguyen, T. Dung Nguyen, H. T. Duc, M. C. Pham "An electrochemical ELISA-like immunosensor for miRNAs detection based on screen-printed gold electrodes modified with reduced graphene oxide and carbon nanotubes." *Biosens. Bioelectron.* 62 (2014) 25–30 (Citado en la pag [196](#).)
- [261] G. Lai, H. Zhang, J. Yong, A. Yu "In situ deposition of gold nanoparticles on polydopamine functionalized silica nanosphere for ultrasensitive nonenzymatic electrochemical immunoassay." *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 178–83 (Citado en la pag [196](#).)
- [262] M. M. Neves, M. B. González-García, C. Delerue-Matos, A. Costa-García "Multiplexed electrochemical immunosensor for detection of celiac disease serological markers" *Sens. Actuators B* 187 (2013) 33–39 (Citado en las pags [203](#) y [212](#).)

- [263] M. Moreno, A. S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, M. C. Rodríguez, Y. Jalit, G. a. Rivas "Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using carbon nanotube modified screen-printed electrodes." *Talanta* 80(5) (2010) 2149–56 (Citado en la pag 205.)
- [264] Y.-L. Su, C.-Y. Tai, J.-M. Zen "A Simple Method to Tune Up Screen-Printed Carbon Electrodes Applicable to the Design of Disposable Electrochemical Sensors" *Electroanalysis* 25(11) (2013) 2539–2546 (Citado en la pag 205.)
- [265] J. V. Rushworth, A. Ahmed, H. H. Griffiths, N. M. Pollock, N. M. Hooper, P. a. Millner "A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers" *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 83–90 (Citado en la pag 205.)
- [266] L. Liu, C. Tan, J. Chai, S. Wu, A. Radko, H. Zhang, D. Mandler "Electrochemically "writing" graphene from graphene oxide." *Small* 10(17) (2014) 3555–9 (Citado en la pag 215.)
- [267] S. E. Fosdick, K. N. Knust, K. Scida, R. M. Crooks "Bipolar electrochemistry" *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52(40) (2013) 10438–10456 (Citado en la pag 216.)
- [268] G. Loget, J. Roche, E. Gianessi, L. Bouffier, A. Kuhn "Indirect bipolar electrodeposition" *J. Am. Chem. Soc.* 134(49) (2012) 20033–20036 (Citado en la pag 216.)
- [269] G. Loget, J. Roche, A. Kuhn "True bulk synthesis of Janus objects by bipolar electrochemistry" *Adv. Mater.* 24(37) (2012) 5111–5116 (Citado en la pag 216.)
- [270] M. Miranda-Hernández, M. Palomar-Pardavé, N. Batina, I. González "Identification of different silver nucleation processes on vitreous carbon surfaces from an ammonia electrolytic bath" *J. Electroanal. Chem.* 443(1) (1998) 81–93 (Citado en la pag 216.)
- [271] D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García "Effect of metals on silver electrodeposition Application to the detection of cisplatin" *Electrochim. Acta* 50(9) (2005) 1895–1902 (Citado en la pag 216.)
- [272] D. Hernández-Santos, M. B. González-García, A. Costa-García "Electrochemical determination of gold nanoparticles in colloidal solutions" *Electrochim. Acta* 46(4) (2000) 607–615 (Citado en las pags 216 y 234.)

- [273] A. de la Escosura-Muñiz, M. Maltez-da Costa, A. Merkoçi "Controlling the electrochemical deposition of silver onto gold nanoparticles: reducing interferences and increasing the sensitivity of magnetoimmuno assays." *Biosens. Bioelectron.* 24(8) (2009) 2475–2482 (Citado en las pags 216 y 234.)
- [274] E. Herrero, L. J. Buller, H. D. Abruña "Underpotential deposition at single crystal surfaces of Au, Pt, Ag and other materials" *Chem. Rev.* 101(7) (2001) 1897–930 (Citado en la pag 218.)
- [275] D. H. Son, S. M. Hughes, Y. Yin, A. Paul Alivisatos "Cation exchange reactions in ionic nanocrystals." *Science* 306(5698) (2004) 1009–1012 (Citado en la pag 218.)
- [276] K. Huang, K. Xu, J. Tang, L. Yang, J. Zhou, X. Hou, C. Zheng "Room Temperature Cation Exchange Reaction in Nanocrystals for Ultrasensitive Speciation Analysis of Silver Ions and Silver Nanoparticles" *Anal. Chem.* 87(13) (2015) 6584–6591 (Citado en la pag 218.)
- [277] F. Lisdat, D. Schäfer, A. Kapp "Quantum dots on electrodes-new tools for bioelectroanalysis." *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 3739–3752 (Citado en la pag 219.)
- [278] Y. Jiang, S. Yu, J. Li, L. Jia, C. Wang "Improvement of sensitive Ni(OH)<sub>2</sub> nonenzymatic glucose sensor based on carbon nanotube/polyimide membrane" *Carbon N. Y.* 63 (2013) 367–375 (Citado en la pag 227.)
- [279] T. M. Day, P. R. Unwin, J. V. Macpherson "Factors controlling the electrodeposition of metal nanoparticles on pristine single walled carbon nanotubes." *Nano Lett.* 7(1) (2007) 51–57 (Citado en la pag 229.)
- [280] M. K. Sharma, J. Narayanan, S. Upadhyay, A. K. Goel "Electrochemical immunosensor based on bismuth nanocomposite film and cadmium ions functionalized titanium phosphates for the detection of anthrax protective antigen toxin" *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 299–304 (Citado en las pags 239, 274 y 282.)
- [281] S. J. Konopka, B. McDuffie "Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry" *Anal. Chem.* 42(14) (1970) 1741–1746 (Citado en la pag 259.)
- [282] M. Z. Luo, R. P. Baldwin "Characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes" *J. Electroanal. Chem.* 387(1-2) (1995) 87–94 (Citado en la pag 288.)

- [283] F. W. Campbell, S. R. Belding, R. Baron, L. Xiao, R. G. Compton "The Hydrogen Evolution Reaction at a Silver Nanoparticle Array and a Silver Macroelectrode Compared: Changed Electrode Kinetics between the Macro- and Nanoscales" *J. Phys. Chem. C* 113(33) (2009) 14852–14857 (Citado en la pag 290.)
- [284] L. C. Jiang, W. D. Zhang "A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles-modified carbon nanotube electrode" *Biosens. Bioelectron.* 25(6) (2010) 1402–1407 (Citado en la pag 299.)
- [285] N. a. Choudhry, D. K. Kampouris, R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks "Next generation screen printed electrochemical platforms: Non-enzymatic sensing of carbohydrates using copper(ii) oxide screen printed electrodes" *Anal. Methods* 1(3) (2009) 183 (Citado en las pags 304 y 309.)
- [286] Q. Chen, L. Zhang, G. Chen "Facile Preparation of Graphene-Copper Nanoparticle Composite by in Situ Chemical Reduction for Electrochemical Sensing of Carbohydrates" *Anal. Chem.* 84(1) (2012) 171–178 (Citado en la pag 304.)
- [287] S. Felix, P. Kollu, B. P. Raghupathy, S. K. Jeong, A. N. Grace "Electrocatalytic oxidation of carbohydrates and dopamine in alkaline and neutral medium using CuO nanoplatelets" *J. Electroanal. Chem.* 739 (2015) 1–9 (Citado en la pag 305.)
- [288] C.-L. Sun, W.-L. Cheng, T.-K. Hsu, C.-W. Chang, J.-L. Chang, J.-M. Zen "Ultrasensitive and highly stable nonenzymatic glucose sensor by a CuO/graphene-modified screen-printed carbon electrode integrated with flow-injection analysis" *Electrochem. commun.* 30 (2013) 91–94 (Citado en las pags 308 y 309.)
- [289] X. Niu, M. Lan, H. Zhao, C. Chen "Highly sensitive and selective nonenzymatic detection of glucose using three-dimensional porous nickel nanostructures." *Anal. Chem.* 85(7) (2013) 3561–9 (Citado en las pags 308 y 309.)
- [290] T. K. Huang, K. W. Lin, S. P. Tung, T. M. Cheng, I. C. Chang, Y. Z. Hsieh, C. Y. Lee, H. T. Chiu "Glucose sensing by electrochemically grown copper nanobelt electrode" *J. Electroanal. Chem.* 636(1-2) (2009) 123–127 (Citado en la pag 309.)
- [291] M. García, A. Escarpa "A class-selective and reliable electrochemical monosaccharide index in honeys, as determined using nickel and nickel-copper nanowires." *Anal. Bioanal. Chem.* 402(2) (2012) 945–53 (Citado en la pag 309.)

- [292] M. García, A. Escarpa "Disposable electrochemical detectors based on nickel nanowires for carbohydrate sensing." *Biosens. Bioelectron.* 26(5) (2011) 2527–33 (Citado en la pag 309.)
- [293] C.-H. Lien, J.-C. Chen, C.-C. Hu, D. S.-H. Wong "Cathodic deposition of binary nickel-cobalt hydroxide for non-enzymatic glucose sensing" *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45(3) (2014) 846–851 (Citado en la pag 309.)
- [294] M. Hjiri, R. Dhahri, N. Ben Mansour, L. El Mir, M. Bonyani, A. Mirzaei, S. Leonardi, G. Neri "Electrochemical properties of a novel Ni-doped nanoporous carbon" *Mater. Lett.* 160 (2015) 452–455 (Citado en la pag 309.)
- [295] J. Yang, J.-H. Yu, J. Rudi Strickler, W.-J. Chang, S. Gunasekaran "Nickel nanoparticle-chitosan-reduced graphene oxide-modified screen-printed electrodes for enzyme-free glucose sensing in portable microfluidic devices." *Biosens. Bioelectron.* 47C (2013) 530–538 (Citado en la pag 309.)
- [296] Z. Zhuang, X. Su, H. Yuan, Q. Sun, D. Xiao, M. M. F. Choi "An improved sensitivity non-enzymatic glucose sensor based on a CuO nanowire modified Cu electrode." *Analyst* 133(1) (2008) 126–132 (Citado en la pag 309.)
- [297] J. Biscay, E. Costa Rama, M. B. González García, J. M. Pingarrón Carrazón, A. Costa-García "Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes" *Electroanalysis* 23(1) (2011) 209–214 (Citado en la pag 311.)