

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL**



**PLATAFORMAS (BIO)SENSORAS BASADAS  
EN LA QUÍMICA DE LAS SALES DE  
DIAZONIO Y NANOMATERIALES**

**César Gómez Anquela**

Tesis Doctoral

Madrid, Junio de 2015







**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL**



**PLATAFORMAS (BIO)SENSORAS BASADAS  
EN LA QUÍMICA DE LAS SALES DE  
DIAZONIO Y NANOMATERIALES**

Memoria que presenta el licenciado en Química

**César Gómez Anquela**

para optar al grado de Doctor.



Dña. Maria Encarnación Lorenzo Abad, Doctora en Ciencias Químicas y Catedrática del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, y D. Félix Pariente Alonso, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular del mismo departamento.

Informan que la presente memoria, titulada: "*Plataformas (bio)sensores basadas en la química de las sales de diazonio y nanomateriales*" ha sido desarrollada por D. César Gómez Anquela en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo nuestra dirección.

Asimismo, hacemos constar que el trabajo descrito en dicha memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que, como directores del trabajo de investigación, autorizamos su presentación para que pueda ser defendida por el doctorando como Tesis Doctoral en acto público en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firmamos el presente documento en Madrid, a 8 de Mayo de 2015.

Fdo. M<sup>a</sup> Encarnacion Lorenzo Abad

Fdo. Felix Pariente Alonso





A mis padres,  
Lorena  
y Ainara.



# ÍNDICE

---



## CAPITULO I. INTRODUCCION.

1. Sensores químicos.....	1
2. Metodologías de modificación de superficies electródicas.....	5
3. Modificación superficial mediante enlace covalente. Procedimiento de injerto.....	8
4. Formación de sales de diazonio. Reacción de diazotación.....	13
5. Modificación de superficies electródicas mediante electroinjerto de Sales de diazonio.....	16
5.1. Microbalanza Electroquímica de Cristal de cuarzo como herramienta en el estudio de interfaces electródicas.....	24
5.2. Caracterización de superficies mediante elipsometría espectroscópica.....	28
6. Sales de diazonio en el desarrollo de plataformas sensoras de NADH.....	30
7. Biosensores.....	33
7.1. Biosensores basados en la enzima Alcohol Deshidrogenasa.....	34
8. Utilización de nanomateriales en el desarrollo de plataformas sensoras y biosensoras.....	39

## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

1. Objetivos.....	51
2. Plan de trabajo.....	52

## CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Reactivos y disoluciones.....	57
1.1. Reactivos.....	57
1.2. Disoluciones.....	58
2. Procedimientos.....	59
2.1. Síntesis de Grafeno Oxidado.....	59
2.2. Síntesis de Nanopartículas de Oro.....	59
2.3. Activación de superficies electródicas.....	60
2.3.1. Activación de los electrodos serigrafados de carbono.....	60
2.3.2. Activación de superficies de oro.....	60

2.4. Reacción de diazotación de colorantes. ....	62
2.5. Modificación de superficies electródicas con sales de diazonio. ....	64
2.5.1. Electrodo serigrafiado de carbono. ....	64
2.5.2. Electrodo de oro. ....	64
2.6. Electrodo de oro modificado con películas de grafeno oxidado. .	65
2.7. Fabricación del biosensor. ....	67
3. Instrumentación. ....	67
4. Cálculo de parámetros y constantes de interés. ....	74
4.1. Cálculo del recubrimiento superficial del material depositado sobre la superficie electródica. ....	74
4.3. Cálculo de la constante catalítica mediante el método de Galus. ..	75

**CAPITULO III. ELECTROINJERTO DE SALES DE DIAZONIO SOBRE LA SUPERFICIE DE ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO.**

1. Electroinjerto de sales de diazonio sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono. ....	80
2. Electroinjerto de la sal de diazonio del Azure A sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono. ....	91
3. Optimización del procedimiento de electroinjerto. ....	97
3.1. Influencia del número de ciclos de potencial y de la concentración de Azure A en la etapa de electroinjerto. ....	97
3.2. Efecto de la velocidad de barrido en la etapa de electroinjerto... ..	101
3.3. Efecto del pH en el electrodo modificado. ....	104
3.4. Cinética de transferencia electrónica a través de películas electroinjetadas de Azure A. ....	106
4. Estudio de la Electrooxidación de NADH sobre electrodos modificados con Azure A. ....	109
4.1. Influencia de la cantidad de Azure A electroinjetado sobre la oxidación catalítica de NADH. ....	112
4.2. Efecto del pH en la electrocatálisis de NADH. ....	115
4.3. Cinética de transferencia electrónica en la oxidación electrocatalítica de NADH. ....	116
4.4. Estudio del coeficiente de difusión del NADH y la constante catalítica mediante el método de Galus. ....	119
4.5. Propiedades analíticas del sensor de NADH. ....	121

#### CAPITULO IV. ELECTROINJERTO SOBRE ELECTRODOS DE ORO.

1. Electroinjerto de Azure A sobre electrodos de oro.....	130
2. Optimización de las condiciones de electroinjerto. ....	134
2.1. Efecto de la concentración de la sal de diazonio en la etapa de electroinjerto. ....	134
2.2. Optimización del número de ciclos de electroinjerto.....	136
3. Estudio del espesor de la película electroinjertada de Azure A mediante elipsometría.....	140
4. Estudio del procedimiento de electroinjerto de Azure A mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM). ....	143
5. Influencia del espesor de la película de Azure A sobre la transferencia electrónica.....	149
5.1. Estudio mediante Microscopía de Barrido Electroquímico (SECM). 149	
5.2. Cálculo de $K_s$ y $\alpha$ . ....	153
6. Electrocatálisis de NADH sobre electrodos de oro modificados mediante electroinjerto de Azure A.....	158
6.1. Estudio de la constante catalítica mediante el método de Galus. 160	
6.2. Sensor de NADH: Propiedades analíticas. ....	162

#### CAPITULO V. ELECTROINJERTO SOBRE ELECTRODOS HÍBRIDOS GRAFENO OXIDADO- ORO.

1. Electroinjerto sobre electrodos híbridos grafeno oxidado-oro.....	168
1.1. Caracterización de la interacción entre Azure A y Grafeno oxidado mediante métodos espectrofotométricos.....	170
2. Diseño y fabricación un electrodo híbrido grafeno oxidado-oro.....	177
2.1. Estudio de la incorporación de grafeno oxidado mediante Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).....	178
2.2. Caracterización del electrodo híbrido grafeno oxidado-oro mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	181
2.3. Caracterización mediante microscopia de fuerza atómica (AFM). 183	
2.4. Caracterización mediante elipsometría espectroscópica. ....	185
2.5. Caracterización mediante microscopía Raman. ....	188

3. Electroinjerto de Azure A sobre electrodos híbridos Grafeno Oxidado/Oro. ....	192
3.1. Estudio del electroinjerto de Azure A sobre electrodos híbridos GO/Au mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM).....	197
3.1.1. Propiedades de la película electroactiva. ....	197
3.1.2. Estudio de la cinética de electroinjerto.....	203
3.2. Cinética de transferencia electrónica a través de películas electroinjertadas de Azure A sobre electrodos GO/Au.....	206
4. Estudio de la oxidación electrocatalítica de NADH sobre electrodos GO/Au modificados con Azure A. ....	210
4.1. Efecto del espesor de la película en la electrocatálisis. ....	212
4.2. Estudio de la constante catalítica mediante el método de Galus. ....	214
4.3. Sensor de NADH: propiedades analíticas. ....	215

## CAPITULO VI. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE ETANOL.

1. Estudio de la inmovilización de la enzima ADH sobre el sensor de NADH. ....	224
2. Incorporación de nanopartículas de oro (AuNPs) en la construcción del biosensor de ADH. ....	226
2.1. Caracterización del tamaño de las nanopartículas de oro (AuNPs). ....	228
2.2. Cálculo de la concentración de nanopartículas mediante TXRF... ..	231
2.3. Respuesta del biosensor ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE.....	232
3. Recubrimiento polimérico de la superficie biosensora. ....	234
3.1. Respuesta del biosensor preparado con el recubrimiento polimérico. ....	238
4. Estudio cinético de la reacción enzimática. ....	240
5. Optimización de la respuesta del biosensor. ....	246
5.1. Optimización de la carga de enzima.....	246
5.2. Influencia de la concentración de nanopartículas de oro. ....	248
5.3. Optimización de la concentración de NAD <sup>+</sup> en la respuesta del biosensor. ....	249
5.4. Efecto del pH.....	251
6. Propiedades analíticas del biosensor. ....	253



6.1. Estabilidad y tiempo de vida del dispositivo biosensor..... 257

CONCLUSIONES.

Conclusiones..... 264

REFERENCIAS.

Referencias..... 270

PUBLICACIONES.

Publicaciones.....285





# CAPÍTULO I

---

## INTRODUCCIÓN



En la actualidad, la necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que se presentan en los sectores industrial, clínico, agroalimentario, medioambiental y forense, requiere el uso de técnicas sencillas, sensibles, de bajo coste, rápidas, fiables y portátiles que permitan la detección *in situ* de analitos de interés. Esta necesidad ha promovido en los últimos años el desarrollo de los sensores químicos, en general, y de los biosensores en particular. Con la finalidad de mejorar las propiedades y características de estos dispositivos, la investigación científica en este campo ha de ir encaminada hacia la mejora de los parámetros que los configuran. En este sentido, la utilización de nuevas tecnologías y materiales va encaminada a mejorar estos dispositivos y los hagan más eficientes, fiables y con un ámbito de utilización cada vez mayor.

## **1. Sensores químicos.**

Un sensor químico se define, según la IUPAC [1], como un dispositivo instrumental que transforma información química, proveniente de un cambio en una propiedad física característica o de una reacción química en la que esté involucrada la sustancia objeto de análisis, en información con utilidad analítica. Está constituido por un sistema de reconocimiento selectivo o específico para cada analito, denominado receptor o elemento de reconocimiento, que acoplado a un transductor permite convertir el evento de reconocimiento analito-receptor en una señal. Esta señal, una vez amplificada y procesada genera información con utilidad analítica.

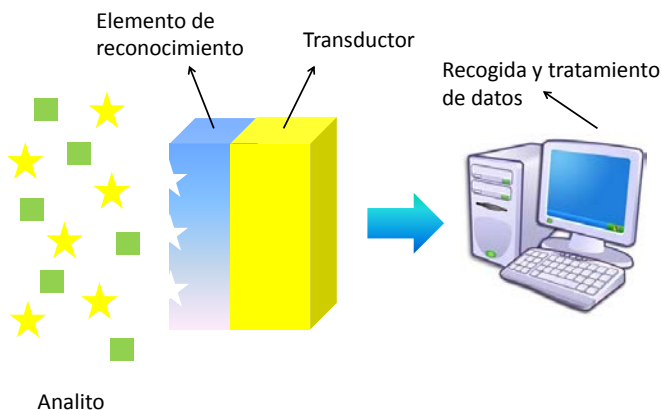


Fig.1. Esquema de un sensor químico.

Los sensores químicos pueden clasificarse en base a distintos criterios, bien en función del tipo de transductor utilizado o bien según sea la naturaleza del elemento de reconocimiento. Según el tipo de transductor, los sensores se pueden clasificar en:

- Electroquímicos.
- Piezoeléctricos.
- Ópticos.
- Térmicos.

En una nueva era donde se tiende a desarrollar dispositivos de análisis portátiles, de fácil manejo, rápidos, sencillos y sensibles los transductores que presentan un mayor potencial son los de tipo electroquímico y se denominan electrodos. En estos últimos 30 años, los (bio)sensores electroquímicos han obtenido una gran expansión, debido especialmente a su gran cantidad de aplicaciones a nivel industrial y biotecnológico. Este rápido crecimiento ha sido posible entre otros factores por la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de (bio)sensores y permite reducir los costes de

fabricación, asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área pequeña de los electrodos requeridos habitualmente para la realización de medidas electroquímicas. Esta miniaturización conlleva una ventaja adicional que es un mínimo consumo de reactivos, de modo que disponer de un área de trabajo mucho menor requiere menos cantidad de material químico y/o biológico en la fabricación del dispositivo, a la vez que permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños. Otra de sus ventajas es su gran versatilidad, puesto que es posible disponer de electrodos fabricados de una gran variedad de materiales, tanto conductores (carbono, platino, plata y oro, entre otros) como semiconductores (silicio, germanio o arseniuro de galio) e incluso nanomateriales de última generación como grafeno o nanopartículas metálicas.

Frente a otras técnicas analíticas, por ejemplo las cromatográficas, estos dispositivos presentan una serie de ventajas, como son la disminución de las operaciones preliminares de análisis, la capacidad de llevar a cabo medidas analíticas *in situ* ó el bajo coste de la instrumentación requerida. Con el objetivo de aumentar la implantación de los (bio)sensores en el mercado se buscan dispositivos que presenten mejores propiedades analíticas, como mayores intervalos de respuesta y límites de detección cada vez mas bajos, esto en la actualidad se esta logrando gracias a la mejora de las metodologías de fabricación y a la investigación de los nuevos materiales con los que se diseñan. En este sentido, la complejidad en el diseño de sensores es un factor modulable en función de la aplicación que se desee, y dado que son fácilmente miniaturizables se posibilita la medida en zonas de pequeñas dimensiones, permitiendo incluso medidas continuas *in situ*, en un amplio abanico de disciplinas como biomedicina [2] o análisis ambiental [3].



Los sensores químicos también pueden clasificarse en función del elemento de reconocimiento utilizado, diferenciándose entre.

- Sensores.
- Biosensores.

La selectividad o especificidad del evento de reconocimiento del analito, puede ser aprovechada con fines analíticos para el diseño y preparación de plataformas sensoras y biosensoras. El transductor, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el elemento de reconocimiento, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta eléctrica, que luego es amplificada o procesada y que estará relacionada con la concentración de dicho analito. El buen funcionamiento del dispositivo (bio)sensor dependerá, por tanto, del grado de acoplamiento resultado de la interacción analito-receptor y el transductor.

Los (bio)sensores electroquímicos, en función de la propiedad que se evalúe, se pueden clasificar en [4]:

- Amperométricos. Se basan en la medida de la corriente faradaica asociada a una reacción electroquímica producida sobre la superficie del electrodo, cuando se aplica un potencial constante. Un caso particular son los dispositivos voltamperométricos en los que simultáneamente se varía el potencial aplicado. Si se considera que el transporte de la especie al electrodo solamente se realiza mediante difusión, la intensidad de corriente está relacionada con la concentración de dicha especie según la expresión (1).

$$i = nFAD_0 \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \quad (1)$$

Donde  $n$  es el número de electrones involucrados en la reacción faradaica,  $F$  la constante de Faraday,  $D_0$  el coeficiente de

difusión,  $C$  la concentración de la especie de interés y  $x$  el espesor de la doble capa eléctrica.

- Potenciométricos. Su funcionamiento se basa en la medida de la diferencia de potencial que se establece entre un electrodo de trabajo y uno de referencia, en ausencia de corriente eléctrica aplicada. Esta puede relacionarse con la concentración de analito presente mediante la ecuación de Nerst.

- Conductimétricos. Estos transductores se basan en la medida de la conductividad específica (inversa de la resistencia) de las disoluciones.

- Capacitométricos. Basados en la medida de la permitividad (constante dieléctrica del medio) o de la impedancia (resistencia de la disolución al paso de corriente); siendo estas propiedades dependientes de la composición de la disolución.

- Culombimétricos. Cuando se mide la cantidad de carga eléctrica requerida para oxidar (o reducir) una especie electroactiva presente en disolución.

En la actualidad los dispositivos más utilizados son los amperométricos y voltamperométricos pues presentan importantes ventajas como son la elevada sensibilidad, la simplicidad de fabricación y la capacidad de miniaturización.

## **2. Metodologías de modificación de superficies electródicas.**

La integración del sistema de reconocimiento y el transductor se realiza, en gran medida, mediante modificación química de la superficie. Ésta se realiza con el objetivo de mejorar las propiedades del dispositivo; de modo que sea selectivo para un analito determinado, o bien para mediar reacciones redox, termodinámica o cinéticamente dificultadas, e incluso inhibidas sobre el electrodo sin modificar. Adicionalmente, la modificación de superficies electródicas

pretende conseguir cinéticas de transferencia de carga entre la superficie electródica y el analito más rápidas y consecuentemente, mejorar propiedades analíticas tales como selectividad, sensibilidad y estabilidad.

Utilizar un electrodo modificado químicamente adecuado, implica ejercer un mayor control sobre las características del material, tanto en sus propiedades electroquímicas como en la reactividad superficial. Se han descrito multitud de metodologías para llevar a cabo la modificación de superficies electródicas. En el presente trabajo se hará referencia a la tipología utilizada por Bard y Faulkner [5], distinguiéndose los posibles tipos de funcionalización según:

- Modificación por adsorción. La adsorción puede realizarse bien mediante la aplicación de un potencial (electroadsorción), o bien depositando el compuesto disuelto tras la evaporación del disolvente. En el presente trabajo la modificación por adsorción se referirá a la debida a fenómenos físicos (fisisorción). Un ejemplo típico de fisisorción, es la adsorción de moléculas que contengan anillos aromáticos con múltiples enlaces  $\pi$  deslocalizados a electrodos de carbono.
- Modificación mediante polimerización. Los polímeros aportan la posibilidad de llevar a cabo reacciones tridimensionales en la superficie del electrodo lo que conlleva una gran ventaja respecto a la adsorción. Los recubrimientos poliméricos se pueden obtener utilizando polímeros preformados, mediante polimerización electroquímica, o bien mediante precipitación electroquímica de una disolución de polímero preformado. Dentro de esta metodología, la electropolimerización es un procedimiento de tipo electroquímico, por el que mediante la imposición de un potencial o la aplicación de ciclos de potencial a una disolución que contiene el monómero, se forma

una matriz polimérica generalmente conductora. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado en el diseño y fabricación de dispositivos sensores, ya que permite la inclusión de moléculas de interés, como por ejemplo vitaminas, enzimas, células, etc, dentro de la matriz polimérica [6].

Entre los compuestos descritos en la electropolimerización de se encuentra la familia de las fenotiazinas y fenazinas, utilizados ampliamente en los últimos años como monómeros en la modificación de distintas superficies [7].

- Modificación por formación de enlace covalente. Este enlace se produce entre determinados grupos funcionales del reactivo modificador y otros presentes en la superficie del electrodo. La generación de grupos funcionales sobre la superficie del electrodo puede llevarse a cabo mediante el tratamiento físico-químico de estas o bien derivatizando la superficie con moléculas que presenten grupos funcionales adecuados.

El presente trabajo se centra exclusivamente en el desarrollo, caracterización y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos modificados mediante enlace covalente.

### **3. Modificación superficial mediante enlace covalente. Procedimiento de injerto.**

La modificación mediante enlace covalente es una metodología que se implementó con el fin de subsanar las desventajas que presentaban métodos como la adsorción o la polimerización, tales como la baja estabilidad en el caso de la adsorción o el escaso control de la estructura y las propiedades del polímero formado. En un primer momento, la formación de un enlace de tipo covalente entre la superficie del electrodo y el modificador se llevó a cabo aprovechando los grupos funcionales presentes en la superficie del material electrodo o, cuando no los hubiere, generándolos mediante procedimientos físicos o químicos, para posteriormente mediante reacciones químicas establecer el enlace covalente. No obstante, estas metodologías implicaban la utilización de condiciones experimentales muy agresivas como por ejemplo la necesidad de utilizar de ácidos fuertes [8], la aplicación de potenciales anódicos o catódicos extremos [9] e incluso la utilización de plasma [10], que modificaban irreversiblemente, cuando no dañaban, la superficie del electrodo. En este sentido, estos procedimientos de formación de enlace covalente, dada su escasa operatividad, no suponían una ventaja real respecto a las metodologías de modificación anteriormente descritas. Es por ello que durante las últimas décadas, el esfuerzo investigador se ha centrado en la búsqueda de procedimientos basados en la simplicidad, el bajo coste y el alto rendimiento que permitan obtener dispositivos con propiedades novedosas y/o mejoradas.

Una de las metodologías de modificación mediante enlace covalente que presenta mayores perspectivas de futuro es el procedimiento de injerto. El término injerto (o grafting en inglés) proviene de la técnica agrícola de propagación vegetativa artificial

por la que una porción de tejido de una planta, denominada injerto, se une sobre otra ya asentada de tal modo que el conjunto de ambos se desarrolle como un solo organismo. En base a estas consideraciones, el procedimiento de injerto dentro del ámbito científico, se describe como una metodología sencilla por la cual se establece un enlace covalente entre una molécula, que actúa como modificador, y la superficie de un material dando lugar a modificaciones estables y robustas. La formación de este enlace covalente entre la molécula y la superficie electródica confiere a la modificación unas propiedades características; por ejemplo, pues permite obtener electrodos modificados capaces de soportar condiciones tan agresivas como la aplicación de potenciales anódicos y catódicos muy elevados [11], temperaturas superiores a 700 K e incluso la aplicación de ciclos continuos de sonicación [12].

El procedimiento de injerto ha supuesto un gran avance dado que ha permitido realizar la modificación superficial de una gran cantidad de materiales con el objetivo de añadir nuevas funcionalidades como biocompatibilidad [13], incrementar su hidrofiliidad [14], adhesivo molecular [15], antienvenamiento de superficies catalizadoras [16], protección contra la corrosión [17], entre otras.

En función del procedimiento físico-químico por el que se realice el procedimiento de injerto, este se puede clasificar en:

- Quimioinjerto. La formación de enlace covalente está promovida por una reacción química entre la molécula y los grupos funcionales presentes en la superficie [18, 19].
- Termoinjerto. Se produce cuando la radiación térmica promueve la formación del enlace [20, 21]. Este procedimiento se ha observado en polímeros de respuesta

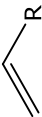
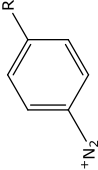
térmica, como por ejemplo en la polimerización mediante injerto del poli(N-isopropilacrilamida) o PNIPAM [22].

- Fotoinjerto. Este procedimiento se produce por la activación de grupos fotosensibles en la molécula mediante radiación UV, que generan especies altamente reactivas capaces de injertarse sobre la superficie del material [23]. Se ha descrito que este procedimiento es particularmente eficiente con azidas y bis-azidas aromáticas [24, 25].
- Electroinjerto. Se produce por la activación de determinados grupos funcionales de la molécula a injertar mediante la aplicación de un potencial eléctrico.

El presente trabajo se centra únicamente en la modificación de la superficie electródica de distintos materiales mediante este último procedimiento, dado que requiere una instrumentación sencilla y de bajo coste a la vez que se puede lograr un gran control sobre la modificación resultante. El electroinjerto es un proceso interfacial que implica la transferencia electrónica entre la superficie del material y un agente modificador que presente en su estructura grupos funcionales capaces de sufrir este procedimiento. Esta transferencia electrónica produce un cambio en la naturaleza del grupo funcional, bien generándose un radical o bien una carga positiva que permite la formación de un enlace covalente entre la superficie electródica y la molécula en cuestión. En función de la naturaleza de la transferencia electrónica, el injerto puede realizarse mediante la oxidación o la reducción del correspondiente grupo funcional. En la siguiente tabla, se resumen los principales grupos funcionales capaces de sufrir reacción de electroinjerto, clasificándolos en función de la naturaleza de la reacción de

electroinjerto, describiéndose también las principales ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.



	Estructura	Ventajas	Inconvenientes
<b>Aminas</b>	$R-NH_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción muy eficiente para aminas primarias.</li> <li>Modificación muy estable.</li> <li>Permite la modificación con biomoléculas (aminoácidos, enzimas, etc)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solamente se ha observado en materiales de carbono y en Au, Pt y Si.</li> <li>La reacción rara vez se da en aminas secundarias y en terciarias no se ha observado.</li> </ul>
<b>Carboxilatos</b>	$R-COO^-$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potenciales de electroinjerto moderados (<math>\approx +1,0</math> V)</li> <li>En algunos casos, el espesor de la película es potencial-dependiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solamente se ha observado en materiales de carbono.</li> <li>Reacción muy rápida. Se favorece la formación de multicapas.</li> <li>Mecanismo incierto.</li> </ul>
<b>Alcoholes</b>	$R-OH$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modificación estable.</li> <li>Permite electroinjetar dendrímeros.</li> <li>Utilizados para limitar la adsorción de proteínas sobre la superficie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solamente se produce en materiales de carbono.</li> <li>Mecanismo y estructura inciertos.</li> </ul>
<b>Reactivos de Grignard</b>	$R-Mg-X$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mecanismo descrito con detalle.</li> <li>Se ha logrado llevar a cabo el injerto promovido por la temperatura y por radiación UV-Vis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Esta favorecida la formación de multicapas.</li> <li>Requiere de condiciones anhídras.</li> <li>Solamente se produce en Si-H.</li> <li>Necesidad de disolventes específicos (THF, éter).</li> <li>El disolvente interviene en el mecanismo de reacción.</li> </ul>
<b>Vinilos</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Electroinjerto sobre óxidos.</li> <li>Se puede realizar un electroinjerto localizado mediante AFM ó SECM.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concomitante con la electropolimeración.</li> <li>Requiere alcanzar potenciales elevados (<math>\approx -2,3</math> V).</li> <li>Ausencia de grupos que se reduzcan a <math>E &gt; E_{vinilo}</math>.</li> <li>El electroinjerto en medio acuoso requiere de la presencia de grupos amonio.</li> <li>Formación de multicapas.</li> </ul>
<b>Sales de diazonio</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Facilidad de preparación.</li> <li>Se electroinjetan en la práctica totalidad de superficies.</li> <li>Utilización de potenciales próximos a 0 V.</li> <li>Permite la modificación con biomoléculas.</li> <li>Modificación muy estable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elevada reactividad. Dificultad para controlar el espesor de la película resultante.</li> <li>Requiere la presencia de al menos una amina aromática primaria.</li> </ul>
<b>Haluros de alquilo</b>	$R-X$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Facilidad de electroinjerto en metales y semiconductores.</li> <li>Futuro prometedor.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menor reactividad.</li> <li>Solamente se ha descrito en medio aprótico.</li> <li>En superficies de carbono requiere de potenciales superiores a <math>-1,3</math> V.</li> <li>Mecanismo incierto.</li> </ul>

Debido a su facilidad de preparación, su amplia disposición y su elevada reactividad, las sales de arildiazonio son unos candidatos idóneos para llevar a cabo la modificación de superficies electródicas mediante electroinjerto con distintas finalidades, entre ellas destacar su uso en electrocatálisis [26, 27].

#### 4. Formación de sales de diazonio. Reacción de diazotación.

Las sales de diazonio son una familia de compuestos que presentan una característica común y es la presencia de un grupo diazonio (NN) en su estructura. El grupo diazo se genera mediante reacción de diazotación entre una amina aromática primaria y un agente causante de la diazotación, el nitrito sódico. La reacción de diazotación fue descubierta por Peter Griess en 1856 gracias a la reacción del ácido pícrico (4,6-dinitro-2-aminofenol) con ácido nitroso [28]. A finales del siglo XIX, las técnicas instrumentales de la época no permitían dilucidar la estructura del compuesto obtenido, por lo que basándose en trabajos previos realizados por Kekulé, le otorgó la siguiente fórmula estructural.

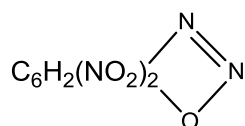


Fig. 2. Estructura de la primera sal de diazonio proveniente del ácido pícrico, propuesta por Kekule.

A mediados del siglo XX, Kornblum, en primer lugar [29], y Hughes y Ingold [30] posteriormente, estudiaron el efecto del pH del medio en la reacción y su influencia en la cinética de la reacción,

respectivamente. Basándose en estos trabajos John H. Ridd y colaboradores en 1961 [31], propusieron un mecanismo para la reacción de diazotación que tras ligeras modificaciones es el aceptado en la actualidad, éste se describe con detalle en el capítulo de materiales y métodos.

La aplicación de reacciones químicas sencillas, como la reacción de diazotación de Griess, que mediante la formación de especies altamente reactivas permite generar un enlace covalente con la superficie de un material ha supuesto, sin lugar a dudas, uno de los avances más significativos dentro de la ciencia de materiales. Asimismo, la multidisciplinaridad con la que se está trabajando en los campos científicos en los últimos años ha permitido que campos como la biomedicina, la biotecnología, la industria química, alimentaria y medioambiental, se estén beneficiando actualmente de sus aplicaciones.

La familia de las fenotiazinas, fenazinas y fenoxazinas están demostrando ser unos compuestos muy prometedores en la preparación de sensores y biosensores electroquímicos debido a su facilidad de preparación, su gran capacidad para llevar a cabo la modificación de superficies y su estabilidad. Dado que todas ellas presentan en su estructura amina aromática primaria son susceptibles de sufrir reacción de diazotación y por tanto pueden ser transformadas en sus correspondientes sales de diazonio.

Esta familia de compuestos se han caracterizado históricamente por sus propiedades antipsicóticas [32], antitumorales [33], o en la industria de los pigmentos y colorantes [34]. Presentan una estructura heterocíclica trianular, donde en el anillo central la posición 3 y 7 está modificada con heteroátomos. En caso de que ambos átomos sean nitrógeno los compuestos derivados se nombran como fenazinas, como por ejemplo el colorante Rojo

Neutro; si uno de los átomos es de oxígeno y otro de nitrógeno se denominan fenoxazinas, como por ejemplo el Azul Nilo, y si el átomo de oxígeno se sustituye por azufre se denominan fenotiazinas, por ejemplo el Azure A o la Tionina.

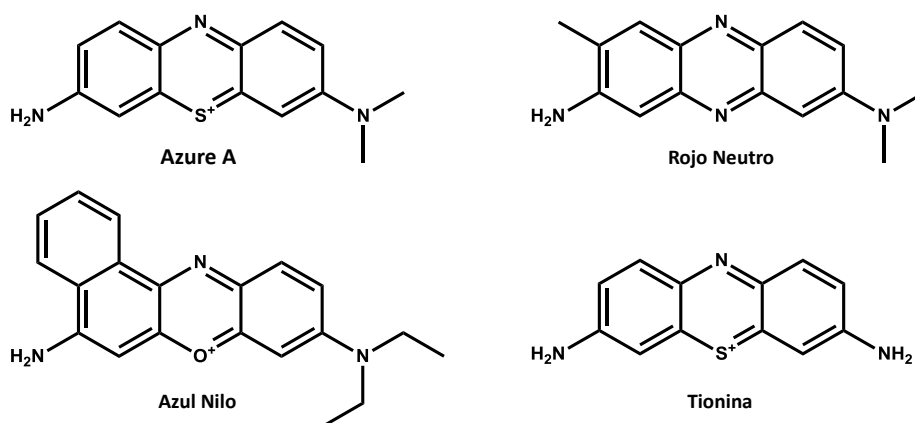


Fig.3. Estructura de las fenazinas, fenotiazinas y fenoxazinas utilizadas en el presente trabajo.

Debido a la existencia de anillos aromáticos en su estructura estas moléculas se caracterizan por poseer una gran deslocalización electrónica a través de la estructura aromática, lo que las confiere de grandes propiedades electrónicas y por tanto pueden ser utilizadas como mediadores redox. Adicionalmente, la estructura casi-planar de estas moléculas permite que pueden ser utilizadas en la modificación de electrodos mediante interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  entre la molécula y la superficie del electrodo. De este modo se ha descrito la modificación por adsorción de superficies electródicas de grafito con el colorante Azul de Meldola, una fenoxacina [35], o con Azul de Toluidina, una fenotiazina [36]. Además, gracias a sus propiedades electrónicas se han utilizado como monómeros en la modificación por

electropolimerización de distintas superficies como carbono vítreo [37], platino [38] u oro [39]. Sin embargo, pese a la gran versatilidad de estos compuestos para llevar a cabo la modificación superficies electródicas, hasta la fecha se han descrito pocos trabajos donde se haya realizado la modificación de electrodos mediante el electroinjerto de sales de diazonio basadas en fenotiazinas, fenoxazinas o fenazinas [40]. Por tanto la modificación de electrodos mediante electroinjerto con estos mediadores redox puede ser utilizado con fines electrocatalíticos, con el objetivo de desarrollar plataformas sensoras y biosensoras para la determinación de NADH u otros analitos.

## **5. Modificación de superficies electródicas mediante electroinjerto de Sales de diazonio.**

El electroinjerto de las sales de diazonio sobre superficies electródicas, es un procedimiento por el cual se establece la transferencia de un electrón entre el material utilizado como electrodo y la correspondiente molécula de sal de diazonio. La transferencia electrónica promueve la reducción electroquímica del grupo diazo, liberándose una molécula de nitrógeno. Concomitante a este proceso reductivo, se genera un radical arilo que se enlaza covalentemente a la superficie electródica. Este procedimiento permite llevar a cabo la modificación de la superficie de un material utilizado como electrodo, bajo condiciones suaves, con cualquier molécula que posea una amina aromática primaria y por tanto sea susceptible de sufrir reacción de diazotación.

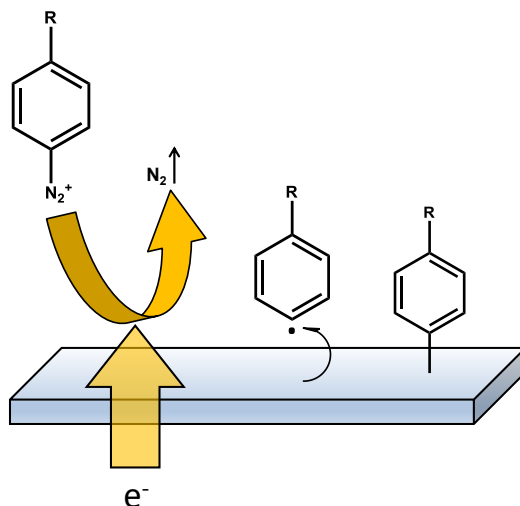


Fig. 4. Esquema general del procedimiento de electroinjerimento de una sal de diazonio.

Jean Pinson y colaboradores en 1992 [41], basándose en trabajos previos donde se había descrito la reducción de sales de arildiazonio mediante técnicas polarográficas [42, 43], descubrieron que mediante la aplicación de ciclos de potencial sobre un electrodo de carbón vítreo se podía llevar a cabo la electroreducción de una sal de diazonio, 4-Nitrobenzenodiazonio (4-NBD) en medio aprótico. La posterior caracterización superficial mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) del electrodo modificado confirmó, no solo la modificación de la superficie electródica, sino que la reacción que se producía era la reducción de la sal de diazonio al observar la desaparición de la señal correspondiente al grupo diazonio y el incremento de intensidad del grupo nitro tras la electroreducción. El resultado obtenido les indujo a sugerir la formación de un enlace covalente entre la superficie electródica y la molécula electroreducida. McCreery y colaboradores, por otra parte, llevaron a cabo dos trabajos fundamentales que permitieron confirmar la formación de un enlace covalente. En primer lugar, el electroinjerimento de 4-NBD les permitió calcular la conductividad

eléctrica a través de la película electroinjertada, midiendo entre la superficie del electrodo y un contacto de mercurio depositado sobre la película electroactiva. Por otro lado, realizaron exhaustivos estudios por técnicas de análisis superficial como FT-IRRAS [44] y espectroscopia Raman [45], acoplando la celda electroquímica a un espectrómetro Raman lo que les permitió monitorizar el espectro de la disolución de la sal de diazonio en función del potencial aplicado. De este modo, confirmaron la desaparición del grupo diazo de la correspondiente sal de diazonio y la formación del enlace covalente entre molécula y superficie electródica.

El trabajo realizado por Goodin y colaboradores, donde mediante resonancia de espín electrónico (ESR) se detectó y caracterizó intermedios de tipo radicalico generados electroquímicamente [46], sentó las bases que permitieron esclarecer que el mecanismo de electroinjerto transcurría mediante la generación de un radical arilo en el anillo que soportaba el grupo amina primaria. La formación de este radical se produce directamente sobre la superficie del electrodo en un mecanismo donde la generación del radical y la formación del enlace covalente se producen de manera concertada, esto implica que la práctica totalidad de los radicales generados se injertan sobre la superficie electródica, así en un electrodo de carbono vítreo se estima que aproximadamente el 84% de los radicales generados se injerta correctamente [12]. No obstante, en algunos casos si la formación del radical es lenta o se produce a cierta distancia de la superficie puede ocurrir que el radical generado se desactive, bien abstrayendo un hidrógeno del medio circundante o bien reaccionando con otra molécula de sal de diazonio dando lugar a un azoderivado. Asimismo, existe la posibilidad de que no se produzca la formación del radical, pudiendo quedar la molécula de sal de diazonio adsorbida sobre la superficie del electrodo gracias a interacciones electrostáticas de tipo

n-n entre los anillos aromáticos y el material electródico. Estos fenómenos disminuyen la eficacia del procedimiento, puesto que disminuyen el área accesible para llevar a cabo el electroinjerto.

Uno de los principales factores que afecta a la generación del radical arilo y, por tanto, a la facilidad con la que se lleva a cabo el procedimiento de electroinjerto es la capacidad de retrodonación de la molécula al grupo diazo. La influencia de este parámetro fue estudiada por Bidan y colaboradores [47], los resultados obtenidos les permitió concluir que cuanto mayor es la retrodonación hacia el grupo diazo, mayor es la facilidad para generar el radical arilo y consecuentemente el potencial necesario para llevar a cabo la reducción de dicho grupo es más moderado de lo que cabría esperar, generalmente en torno a +0.0 V. Es por ello que el procedimiento de electroinjerto se puede realizar fácilmente sobre materiales de diversa naturaleza. La característica fundamental que debe poseer el sustrato es la de presentar propiedades conductoras respecto a la transferencia electrónica, por tanto todos aquellos materiales cuya banda de conducción y banda de valencia se encuentren solapadas son candidatos óptimos a sufrir este procedimiento. De este modo, el electroinjerto de sales de diazonio se ha podido estudiar sobre una gran cantidad de materiales tales como materiales con base de carbono (carbón vítreo [41], HOPG [48], nanotubos de carbono [49], grafeno [50]), metales nobles (oro, platino) así como sobre metales fácilmente oxidables (hierro, zinc, níquel, cobre o cobalto [51]) o nanopartículas de oro [52] e incluso semiconductores donde existe una pequeña separación entre banda de conducción y banda de valencia (silicio [53], arseniuro de galio [54]). A pesar de que el electroinjerto de sales de diazonio sobre materiales con base de carbono ha sido exhaustivamente documentado, dada la facilidad con la que se lleva a cabo. Los trabajos de electroinjerto sobre metales nobles, como el oro, son escasos. El oro es un sustrato ampliamente



utilizado en la industria electrónica debido a su gran resistencia contra la corrosión y su ductilidad.

El mecanismo de electroinjerto sobre superficies de oro es análogo al obtenido para superficies de carbón, pese a que en los primeros trabajos se postuló la formación de enlaces tipo Au-N=N-C [55] o incluso Au-O-C [56] entre la superficie y el mediador redox. En la actualidad, la existencia de técnicas de análisis de superficies más sensibles como la espectroscopía Raman amplificada de superficie (SERS) y espectroscopía de alta resolución de pérdida de energía electrónica (HREELS) han demostrado, sin lugar a dudas, la existencia de enlace directo Au-C entre la superficie del material y el mediador redox [57]. El principal objetivo con el que nació esta nueva aplicación fue la de ofrecer una seria alternativa a la modificación de superficies de oro mediante la formación de películas autoensambladas (SAMs). La modificación mediante electroreducción de sales de diazonio ofrece una serie de ventajas frente a la formación de SAMs que en su mayor parte se derivan de la mayor fortaleza del enlace Au-C frente al Au-S. Así, las modificaciones mediante electroinjerto presentan una mayor estabilidad frente a la oxidación, a la temperatura y al efecto causado por sonicación. Una ventaja adicional es que la transferencia electrónica a través de películas generadas mediante electroinjerto de sales de diazonio es, generalmente, mucho mayor que a través de las cadenas alifáticas presentes en las SAMs, esto se debe fundamentalmente a que se produce la conjugación de los enlaces dobles de los anillos aromáticos que permite una mayor movilidad de los portadores de carga a través de dicha estructura.

Pese a que en la actualidad el electroinjerto de sales de diazonio es uno de los métodos más empleados en la modificación de superficies electrónicas, las principales problemáticas a las que debe hacer frente son, fundamentalmente, dos: la falta de electroactividad

de algunas películas electroinjertadas y la escasa capacidad de control de las propiedades de la película electroactiva debida a la formación de multicapas de material. En primer lugar, cuando el procedimiento de modificación se realiza con sales de diazonio que tras el electroinjerto no presentan electroactividad *per se*, la película no presenta propiedades conductoras respecto a la transferencia de carga [58]. Este es el caso de películas de tipología similar al 4-NBD, donde el grupo no electroactivo, en este caso el grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ), queda orientado hacia el seno de la disolución e inactiva la superficie eléctrica para posteriores aplicaciones [59]. En la figura 2 se muestra los voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto de 4-NBD sobre un electrodo de carbono vítreo. Se puede observar que tras el primer ciclo de electroinjerto se produce una ausencia total de respuesta electroquímica debida a la ausencia de electroactividad de la película generada.

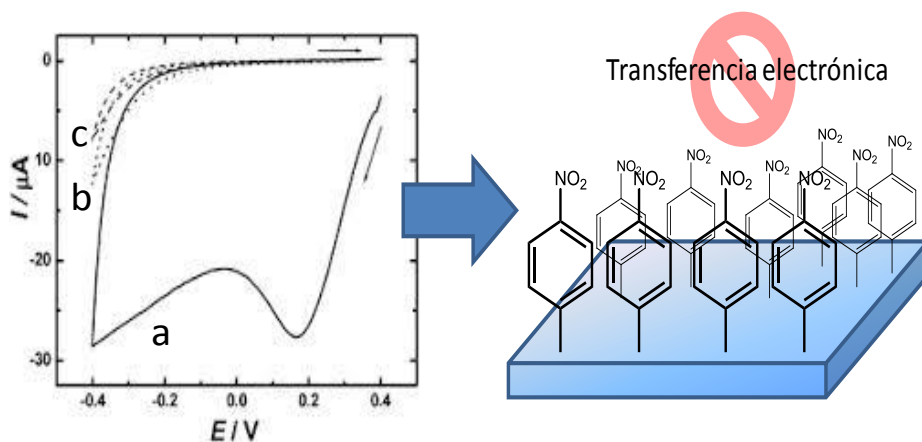


Fig. 5. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al electroinjerto de 4-NBD sobre un electrodo de carbono vítreo. Esquema de correspondiente película electroinjertada.

Cuando se utilizan este tipo de sales de diazonio en el desarrollo de un dispositivo sensor o biosensor es necesario, en la mayoría de los casos, realizar un tratamiento posterior de la superficie obtenida con el objetivo de obtener dispositivos con utilidad analítica. Para ello, uno de los tratamientos más extendido se basa en llevar a cabo la reducción del grupo nitro a amina y posteriormente efectuar la reacción de acoplamiento con la (bio)molécula de interés, como glucosa oxidasa [60] o acetilcolina esterasa [61]. En este sentido, Pinson y Saveant, demostraron que el procedimiento de electroinjerto también se podía llevar a cabo en medio acuoso fuertemente ácido (con pHs inferiores a 3), obteniendo los mismos resultados [62]. Este hecho permitió que la reducción del grupo nitro de la molécula a grupo amina se realizara en un solo paso, por lo que no era necesario transferir el soporte electródico a una disolución ácida tras el electroinjerto, con la consiguiente reducción de errores experimentales y pérdidas de material.

Una metodología más eficiente implica modificar la superficie electródica con sales de diazonio que presenten propiedades redox tras el electroinjerto, lo cual permite obtener una película electroactiva en un solo paso, disminuyendo así el número de operaciones experimentales [63, 64]. La tendencia actual es llevar a cabo la modificación superficial con moléculas que sean electroactivas tras el electroinjerto y simultáneamente permitan introducir nuevas propiedades (bio)catalíticas, como adhesivos moleculares u optoelectrónicas al material de partida [58]. En este sentido, las fenotiazinas, fenoxazinas y fenacinas dada su capacidad de deslocalización electrónica pueden ser unos candidatos idóneos para utilizarlos con fines electrocatalíticos.

El segundo problema que presenta la modificación de electrodos mediante el electroinjerto de sales de diazonio, proviene de la formación de multicapas de material sobre la superficie del

electrodo debido a la elevada reactividad del radical arilo. Kariuki y McDermott describieron por primera vez la formación de multicapas de material mediante el electroinjerto de una sal de diazonio sobre un electrodo de carbono pirolítico [48]. Este efecto se produce por la reacción del radical electrogenerado sobre las posiciones libres del anillo aromático previamente electroinjertado, a través de una reacción de sustitución homolítica aromática ( $S_H$ ).

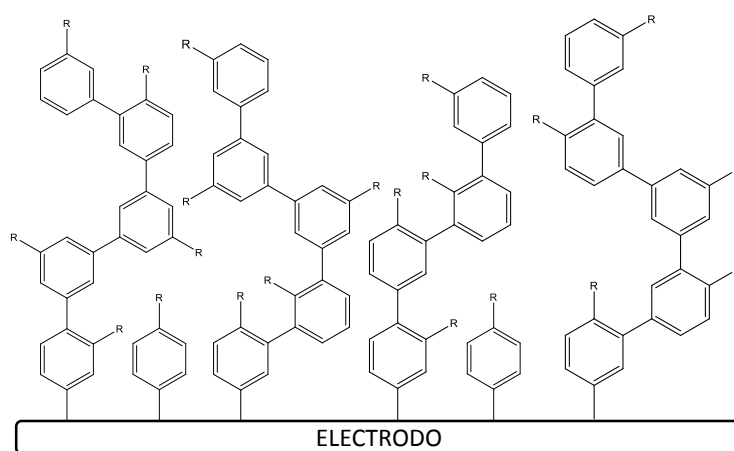


Fig. 6. Simulación del crecimiento en multicapas sobre una superficie electrodica.

La formación de multicapas disminuye de manera ostensible la conductividad eléctrica a través de la película, pues la resistencia a la transferencia de carga aumenta según se incrementa el número de capas [65]. Esta mayor dificultad a la transferencia electrónica se traduce en la menor formación de nuevos radicales arilo, lo que finalmente conlleva la auto-inhibición del crecimiento de la película. El crecimiento descontrolado de las películas electroinjertadas da lugar a películas de naturaleza aislante y de gran espesor, que pueden alcanzar hasta decenas de nanómetros [66]. En este sentido, la utilización de técnicas electroquímicas basadas en la aplicación de un pulso de potencial (cronoamperometría) o en la aplicación de uno

o varios ciclos continuos de potencial (voltamperometría cíclica), permite no solo llevar a cabo el procedimiento de electroinjerto, sino que mediante el control de las condiciones experimentales, tales como tiempo y potencial de deposición ó número de ciclos, permite minimizar la formación de multicapas de material, a la par que posibilita modular las propiedades de la película obtenida, tales como reactividad, conductividad o estabilidad.

Las principales técnicas instrumentales utilizadas para estudiar la formación de multicapas y el espesor de la película mediante el procedimiento de electroinjerto de sales de diazonio son la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) y la elipsometría espectroscópica.

### **5.1. Microbalanza Electroquímica de Cristal de cuarzo como herramienta en el estudio de interfaces electrónicas.**

La microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) es una técnica instrumental que permite estudiar in situ fenómenos electroquímicos que ocurren en la interfase electrodo/electrolito. A través de esta técnica se pueden cuantificar los cambios de masa que se producen en la superficie del electrodo durante un proceso electroquímico, siendo capaz de detectar cambios de  $10^{-9}$  g·cm<sup>-2</sup>. Por tanto es una valiosa herramienta para estudiar fenómenos como la adsorción superficial de compuestos, la formación de películas sobre la superficie de diversos materiales o la electrodeposición de metales.

La técnica se fundamenta en el efecto piezoeléctrico. Este se produce al aplicar una tensión mecánica sobre la superficie de ciertos cristales, ésta tensión mecánica origina un potencial eléctrico a través del cristal, cuya magnitud es proporcional a la tensión aplicada. Dicho

comportamiento es característico de materiales acéntricos, es decir aquellos que cristalizan en grupos espaciales que no poseen un centro de simetría, como por ejemplo el cuarzo. Un cristal de un material acéntrico presenta una polarización causada por la existencia de dipolos asociados a la disposición de los átomos en la red cristalina. Al aplicarse la tensión mecánica se produce el desplazamiento de los átomos de la red cristalina generándose una carga eléctrica medible.

Cuando se aplica un potencial eléctrico a través del cristal de cuarzo, este experimenta una deformación en la dirección de la cizalladura que es proporcional al potencial aplicado y presentara dirección opuesta a esta cuando se aplique un potencial de polaridad opuesta. Así, cuando se aplica un potencial alterno se producirá un movimiento vibracional cuya amplitud será paralela a la superficie del cristal. Este movimiento da lugar a la aparición de una onda acústica transversal que se propaga a través del grosor del cristal,  $I_q$ , y se refleja en su superficie. La frecuencia de resonancia de la onda acústica ( $f_0$ ) se expresa según la ecuación (1).

$$f_0 = v_{tr}/2I_q = (\mu_q \cdot r_q)^{1/2}/2I_q \quad (1)$$

Donde  $V_{tr}$  se define como la velocidad transversal acústica de la onda en  $\text{ms}^{-1}$ ,  $\mu_q$  es el módulo de cizalladura del cristal de cuarzo utilizado ( $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y  $r_q$  la densidad del cuarzo en  $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Cuando se produce la deposición de un material, si se asume que la velocidad acústica y la densidad del material son iguales a las del cuarzo, se puede considerar el depósito del material como una extensión del cristal de cuarzo, en cuyo caso el grosor del material depositado es equivalente a un aumento en el grosor del cristal de cuarzo y por tanto la ecuación anterior se reformularía (2).

$$\Delta f/f_0 = -\Delta I/I_q = -2 f_0 \Delta I/v_{tr} \quad (2)$$

Por tanto, una pequeña variación en el grosor del cristal generaría una variación en la frecuencia de resonancia del mismo. A partir de las ecuaciones (1) y (2), se obtiene la ecuación de Sauerbrey [67] que relaciona los cambios en la masa, por unidad de área, del material depositado en la superficie del electrodo con el cambio en la frecuencia de resonancia del mismo (3).

$$\Delta f = -2 f_0^2 \Delta m / A (\mu_q \cdot r_q)^{1/2} \quad (3)$$

Donde  $\Delta f$  es el cambio de frecuencia observado,  $f_0$  es la frecuencia de resonancia del cristal antes del cambio en la masa,  $m$  es el cambio de masa por unidad de área, y  $A$  el área piezoeléctrica activa del electrodo. El signo negativo implica que la deposición de un material sobre el cristal está asociada a una disminución de la frecuencia de resonancia de este, y viceversa. La ecuación de Sauerbrey normalmente se formula según la expresión (4).

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (4)$$

De este modo, los parámetros característicos del cristal de cuarzo, así como la frecuencia de resonancia, se engloban en una constante denominada  $C_f$ , que toma un valor para los cristales de cuarzo de 5 MHz y corte AT, de  $56.6 \text{ Hz} \cdot \text{cm}^2 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ . Bajo estas condiciones y según la ecuación de Sauerbrey, la sensibilidad de la técnica es de  $17.6 \text{ ng} \cdot \text{Hz}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

En la EQCM el cristal de cuarzo, admas de dispositivo piezoeléctrico, se utiliza como electrodo de trabajo de la celda electroquímica lo que permite relacionar directamente la masa de sustancia depositada, calculada según la ecuación de Sauerbrey (4), con la carga electroquímica o la intensidad de corriente que pasa a través del electrodo, obtenida mediante la ley de Faraday (5).

$$\frac{M}{n} = - \frac{F A \Delta f}{C_f Q} \quad (5)$$

Siendo M la masa molar de la sustancia que sufre el proceso electroquímico ( $\text{g mol}^{-1}$ ), n el número de electrones involucrados en la reacción, F la constante de Faraday, A el área electródica acústicamente activa ( $\text{cm}^2$ ) y Q la carga eléctrica (C).

De este modo, la EQCM permite estudiar simultáneamente los parámetros electroquímicos del proceso redox y los cambios másicos interfaciales midiendo la carga electroquímica o la intensidad de corriente de especie que sufre una reacción electroquímica a la vez que monitoriza la variación de la masa asociada al evento electroquímico. En este sentido, se han encontrado aplicaciones en el estudio de la electrodeposición de metales e incluso en la investigación de la formación y propiedades de polímeros y películas electroquímicamente activas. Pese a las posibilidades que esta técnica ofrece en el estudio de reacciones que cursan en la interfase electrodo/disolución no ha sido muy utilizada en el estudio del electroinjerto de sales de diazonio debido a la mayor dificultad que implica llevar a cabo este procedimiento sobre superficies metálicas de oro [68]. Belanger y colaboradores [55] realizaron un extenso trabajo de caracterización de la estructura de películas electroinjetadas sobre electrodos de oro, siendo pioneros en utilizar la EQCM para caracterizar el proceso electroquímico de electroinjerto sobre este material.



## 5.2. Caracterización de superficies mediante elipsometría espectroscópica.

La elipsometría de reflexión es una técnica no destructiva de caracterización óptica que permite conocer los parámetros ópticos de un material, a partir del cambio de polarización que sufre un haz de luz polarizada, cuando se refleja en su superficie. El campo eléctrico asociado a la onda de luz polarizada puede descomponerse en dos componentes ortogonales: una paralela ( $E_p$ ) y otra perpendicular ( $E_s$ ) al plano de incidencia, definido por el haz incidente, el reflejado y la normal a la superficie.

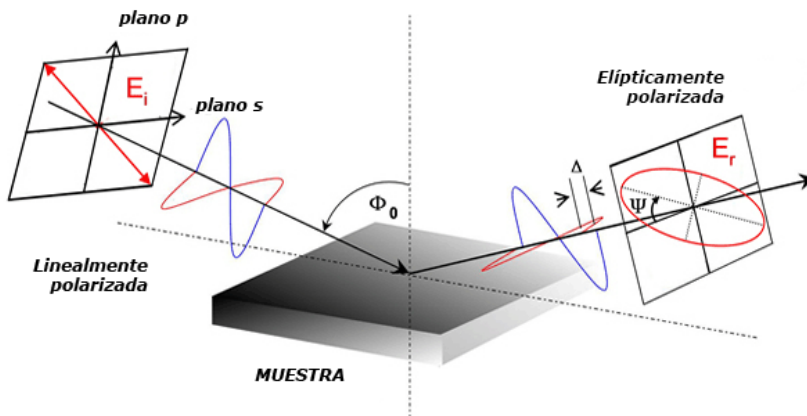


Fig. 7. Reflexión de un haz de luz polarizada en una superficie.

Los componentes de los vectores del campo eléctrico incidente ( $E^i$ ) y reflejado ( $E^r$ ) están relacionados a través de los coeficientes de reflexión de Fresnel,  $r_p$  y  $r_s$ , siendo estos funciones complejas de los parámetros ópticos que involucran la superficie, el ángulo de incidencia del haz de luz polarizada y la longitud de onda. Estos coeficientes proporcionan el cambio en la amplitud y la fase que

experimenta cada componente del haz en la reflexión, pudiéndose definir la variable compleja  $\rho$ , como se describe en la ecuación 6.

$$\rho = r_p / r_s \quad (6)$$

Cuyas partes real e imaginaria podrán expresarse de acuerdo a la ecuación general de la elipsometría (7).

$$\rho = \tan \varphi \cdot e^{j\Delta} \quad (7)$$

Donde  $\Psi$  y  $\Delta$ , son las variables elipsométricas que determinan los cambios diferenciales en la amplitud y fase, respectivamente, ocurridos durante la reflexión (8) y (9).

$$\tan \varphi = \left| r_p / r_s \right| \quad (8)$$

$$\Delta = \delta_p - \delta_s \quad (9)$$

La utilización de la elipsometría como técnica de análisis de la composición y propiedades de películas no homogéneas, requiere de modelos teóricos que relacionen el índice de refracción complejo de las películas con los índices de los constituyentes presentes en la mezcla.

Estos modelos se expresan en términos de respuestas dieléctricas complejas, aunque habitualmente se simplifican en términos de índices de refracción o de constantes dieléctricas, y son válidos siempre y cuando se cumpla la aproximación cuasiestática, que implica que las respuestas dieléctricas obtenidas son despreciables respecto de la longitud de onda de la radiación del haz y por tanto el campo eléctrico se puede considerar uniforme en cualquier punto del espacio. La aproximación de Maxwell-Garnett (MG) del medio efectivo es un modelo teórico útil cuando una de las fases es mayoritaria y la otra se encuentra embebida en la primera,

presentando el conjunto un aspecto microscópico de esferas recubiertas completamente.

Tour y colaboradores demostraron que la elipsometría es muy útil en la caracterización de la estructura y las propiedades ópticas de la película obtenida tras el procedimiento de electroinjerto de sales de diazonio [54]. En este sentido permite obtener información acerca del espesor de la película electroinjertada y por tanto puede evitarse la formación de multicapas y los problemas que se derivan de ésta [69, 70]. Es por ello que en la actualidad, la elipsometría se está postulando como un complemento esencial en el análisis de superficies modificadas, pues su principal ventaja es que permite llevar a cabo el análisis no destructivo de la muestra y es compatible con la utilización de sistemas biológicos.

## **6. Sales de diazonio en el desarrollo de plataformas sensoras de NADH.**

El  $\beta$ -Nicotinamida Adenína Dinucleótido,  $\text{NAD}^+$  en su forma oxidada y  $\text{NADH}$  en su forma reducida, es un cofactor asociado a multitud de procesos redox esenciales para la vida celular. Su principal función es la de actuar como mediador del transporte de electrones en el metabolismo celular, por lo que juega un papel esencial en procesos como la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la respiración celular. Dada su importancia en el metabolismo, este cofactor aparece como grupo prostético en el centro activo de numerosas enzimas oxidasas y deshidrogenasas. En otras ocasiones el  $\text{NAD}^+$  actúa como segundo sustrato de un tipo específico de deshidrogenasas, denominadas deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$ . Estas enzimas, capaces de liberar al medio la forma reducida del cofactor ( $\text{NADH}$ ), se han utilizado con frecuencia en el diseño de

biosensores enzimáticos en la determinación de analitos de gran interés como lactato, glutamato o etanol.

Estructuralmente el NADH está compuesto por dos nucleótidos, adenina y nicotinamida, unidos entre sí por dos grupos fosfato que actúan como puente. En disolución el par redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  implica la transferencia de dos electrones y un protón (figura 7) siendo su potencial termodinámico de  $-0.56\text{ V}$  a pH 7 frente al electrodo de calomelanos.

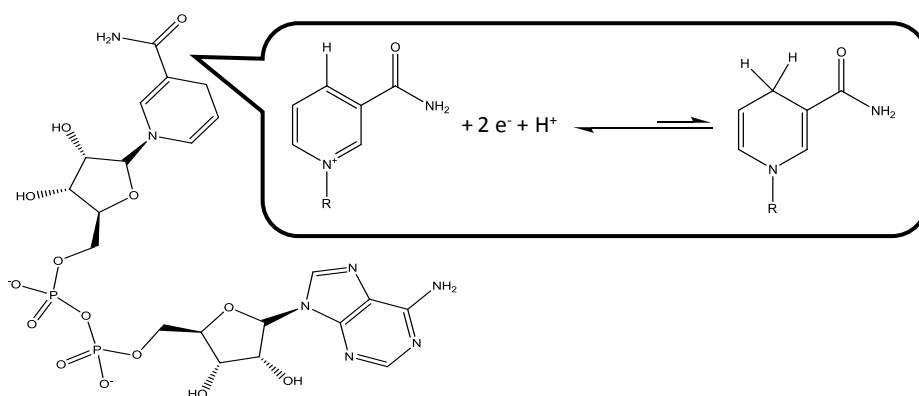


Fig. 7. Esquema del cofactor  $\text{NAD}^+$  y reacción de reducción del cofactor  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

La oxidación directa de NADH sobre electrodos tanto de carbono como de oro es un proceso irreversible, que plantea una serie de problemas puesto que se produce a altos sobrepotenciales que puede llegar a  $+1.0\text{ V}$ . En electrodos de carbono convenientemente activados puede observarse la oxidación irreversible de NADH a potenciales superiores a  $+0.3\text{ V}$ ; no obstante, estos electrodos se desactivan rápidamente [71]. Un inconveniente adicional es el envenenamiento que sufre el electrodo al generarse especies provenientes de reacciones de dimerización y desprotonación en el proceso de oxidación de NADH que se adsorben fácilmente a la superficie del electrodo [72], [73]. Con la finalidad de

superar estos inconvenientes, se llevó a cabo la modificación de la superficie del electrodo con compuestos que actuando como mediadores redox mejoraran la transferencia electrónica entre transductor y biomolécula, reduciendo así la sobretensión de la reacción catalítica. Adicionalmente evitaba la adsorción de sustancias o productos de la reacción enzimática que inhibían la respuesta electroquímica. La utilización de estos mediadores redox dió lugar a lo que se denominó como segunda generación de (bio)sensores. El primer biosensor de segunda generación fue desarrollado por Cass y Turner en 1984, mediante la modificación de un electrodo de carbono utilizando la molécula de ferroceno como mediador en la oxidación de glucosa por parte de la enzima glucosa oxidasa [74]. Desde entonces la búsqueda de compuestos que actúen como mediadores redox y logren mejorar las propiedades del dispositivos, especialmente las propiedades electrocatalíticas, ha supuesto un gran avance en el desarrollo de plataformas sensoras de segunda generación con interés diagnóstico y comercial [71, 75]. En este sentido, las fenazinas, fenotiazinas y fenoxazinas se postularon como una familia de compuestos muy prometedoras, especialmente en el caso concreto de la oxidación electrocatalítica de NADH [76-78]. El primer trabajo donde se utilizaron fenotiazinas en el desarrollo de un sensor de NADH fue descrito por Gorton y Torstensson, donde mediante la modificación por adsorción de un electrodo de grafito con Ethosulfato de fenazina (PES) y Methosulfato de fenazina (PMS) se logró reducir el potencial al que se observaba la oxidación electrocatalítica hasta  $-0.1$  V (vs SCE) [79]. Desde entonces se ha descubierto que existen multitud de fenazinas, fenoxazinas y fenotiazinas que logran reducir de manera considerable el sobrepotencial al que se observa dicha oxidación [80, 81] por lo que es frecuente su utilización en el desarrollo de biosensores.

Por otra parte, las sales de diazonio se han utilizado ampliamente en el desarrollo de sensores de NADH debido fundamentalmente a su capacidad de modificación de superficies electrónicas y a su papel como agentes inhibidores de la adsorción de especies sobre la superficie electrónica [82]. Por consiguiente, la sinergia entre las propiedades electrocatalíticas de mediadores redox como las fenotiazinas, fenoxazinas y fenazinas, con la estabilidad intrínseca y las propiedades anti-venenamiento de los electrodos modificados mediante el electroinjerto de sales de diazonio, puede representar un gran avance en el diseño y construcción de plataformas (bio)sensoras.

## **7. Biosensores.**

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando como elemento de reconocimiento un sistema biológico que está en contacto directo con un elemento transductor.

El desarrollo de los biosensores tiene lugar a comienzos de la década de los 60 con el fin de dotar a las técnicas analíticas existentes, de la selectividad suficiente como para permitir la utilización en muestras reales complejas, sin necesidad de realizar procedimientos de separación previos. Los avances en el campo de la biología molecular y en las técnicas de análisis instrumental han permitido la mejora de los sistemas diseñados; especialmente en cuanto a sencillez, miniaturización, automatización, coste y aplicabilidad. Esto ha impulsado el desarrollo de aplicaciones en campos tan diversos como la biotecnología y biomedicina, el control de procesos industriales en la industria química, alimentaria y medioambiental.

La clasificación de los dispositivos biosensores se puede realizar en función de varios criterios. La clasificación más ampliamente utilizada es la que los distingue en función de la naturaleza del proceso biológico en:

- Biosensores enzimáticos: El elemento de reconocimiento utilizado puede ser enzimas, células, tejidos o microorganismos.
- Biosensores de afinidad: entre los que se encuentran los inmunosensores, los basados en quimiorreceptores y los que utilizan ácidos nucleicos como elementos de reconocimiento.

Los biosensores más utilizados en la actualidad son los enzimáticos, puesto que presentan una gran especificidad lo que permite que puedan operar en matrices complejas, evitando la necesidad de purificación que es indispensable en la mayoría de los métodos analíticos convencionales.

### **7.1. Biosensores basados en la enzima Alcohol Deshidrogenasa.**

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica que poseen una gran selectividad y reactividad. Debido a su gran eficiencia catalítica y a su alta selectividad, las enzimas son los catalizadores más sofisticados que se conocen. El análisis enzimático consiste en la determinación de analitos de interés con la ayuda de enzimas o en la medida de la actividad enzimática endógena. Algunas enzimas precisan de otra molécula orgánica o inorgánica que esté presente en el medio para llevar a cabo su actividad catalítica, este compuesto de naturaleza no proteica se denomina cofactor. Como se ha descrito anteriormente el  $\text{NAD}^+$  es uno de los cofactores más

habituales en los procesos metabólicos, siendo fundamental en las enzimas denominadas deshidrogenasas dependientes de NADH.

La selectividad de las reacciones enzimáticas permite la medida de componentes en mezclas complejas sin la necesidad de recurrir a técnicas de separación. Las especies resultantes de la reacción enzimática pueden ser detectadas por medios fisicoquímicos generando señales que convenientemente tratadas, proporcionan la información requerida del analito en cuestión. La reacción catalítica enzimática es eficiente y además extremadamente selectiva, por lo que se combinan dos factores, de reconocimiento particular y de amplificación, necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de los biosensores. En este sentido, en la actualidad se está llevando a cabo un gran esfuerzo en el desarrollo de metodologías que incorporen las ventajas de los biosensores amperométricos y, a su vez, permitan realizar medidas en continuo e *in situ* del analito de interés incluso dentro del organismo [83-85]. Además, el hecho de que la catálisis enzimática pueda proceder bajo condiciones suaves, permite la determinación de especies relativamente inestables que no pueden determinarse por otros métodos.

La enzima Alcohol Deshidrogenasa tipo I proveniente de *Saccharomyces Cerevisiae* (levadura de cerveza) pertenece a un grupo de enzimas, denominadas deshidrogenasas, que catalizan la oxidación de alcohol a su correspondiente aldehído o cetona.



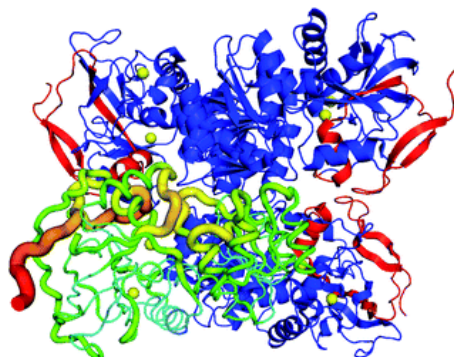


Fig. 8. Estructura de la enzima alcohol deshidrogenasa (*Saccharomyces Cerevisiae*) y reacción de oxidación de etanol mediada por esta.

Es una proteína tetramérica con cuatro subunidades idénticas y una masa total de 150 kDa aproximadamente. Cada subunidad posee dos átomos de zinc, uno está situado en el dominio catalítico, rodeado de dos residuos de cisteína, un residuo de histidina y una glutamina en un entorno tetraédrico, su función es la oxidación del alcohol. El otro átomo de zinc se encuentra rodeado por cuatro cisteínas y actualmente se le otorga exclusivamente un rol estructural. La reacción de oxidación por parte de la enzima presenta una mayor especificidad hacia alcoholes aromáticos y alcoholes alifáticos primarios diferentes del metanol y requiere la presencia un cofactor, la forma oxidada del nicotinamida adenin dinucleótico ( $NAD^+$ ) en el centro activo, actuando como segundo sustrato. Pese a que es necesario incorporarlo bien en disolución o bien mediante atrapamiento dentro de la enzima, permite trabajar con la forma más estable y activa de la proteína la alcohol deshidrogenasa (ADH) en lugar de la alcohol oxidasa (AOx).

El buen funcionamiento de un biosensor enzimático depende en gran medida, de la metodología de inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo

fundamental de la inmovilización es establecer un contacto íntimo entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la actividad y estabilidad del sistema de reconocimiento biológico. El proceso de inmovilización de la enzima es, por tanto, un parámetro crítico dado que si la estructura terciaria de la enzima se ve alterada, se puede producir la pérdida total o parcial de actividad catalítica. Dicha pérdida dependerá de lo agresivo que sea el método de inmovilización y de la sensibilidad del centro activo de la enzima a los cambios conformacionales inducidos durante la inmovilización. Así, en el caso de biosensores basados en enzimas redox con detección electroquímica, la situación de dicho centro activo respecto de la superficie del transductor tras el proceso de inmovilización puede afectar drásticamente a la respuesta del biosensor, pudiendo llegar a obtener cinéticas interfaciales muy lentas o prácticamente nulas si los centros redox de la enzima se encuentran activos pero muy alejados de la superficie del transductor. Asimismo, si la capa de enzima inmovilizada sobre la superficie electródica debe ser lo suficientemente permeable como para permitir el intercambio de sustratos y productos, con objeto de que no se produzca una disminución en la respuesta del biosensor. Los métodos de inmovilización utilizados en la inmovilización enzimática comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento [86], y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento [87].

La industria alimentaria tiene un gran interés en la investigación y el desarrollo de metodologías que les permita ejercer un control directo y exhaustivo de los parámetros que garantizan la calidad del producto durante todo el proceso productivo. En la industria de las bebidas espirituosas, uno de los parámetros más importantes que afectan a las características del producto terminado es el contenido alcohólico, ya que cuantificar el nivel del alcohol

durante el proceso de fabricación constituye el primer paso en la detección de posibles alteraciones en los procesos naturales de la materia prima causado por el uso de procesos tecnológicos, así como la presencia de fraudes alimentarios. En este sentido, la incorporación de sensores y biosensores que permitan la determinación del contenido alcohólico de una muestra está íntimamente ligada al objetivo de garantizar la calidad del producto destinado al consumo humano. Asimismo, durante el proceso de fermentación alcohólica de las bebidas espirituosas es crucial poder determinar y controlar la cantidad de etanol producida, ya que garantiza la calidad de la producción. El etanol, además de aumentar el tiempo de conservación y producir satisfacción sensorial, tiene el papel de enfatizar los compuestos aromáticos aumentando su volatilidad.

Por otra parte, la determinación de los niveles de alcohol en fluidos biológicos, como sangre, saliva o aire espirado, tiene una gran importancia en la investigación de los accidentes de tráfico asociados a su consumo excesivo. Actualmente, los datos aportados por la Comisión Reguladora EuroCare reflejan que en el territorio de la Unión Europea se producen más de 10.000 muertes al año motivadas por el efecto de un consumo excesivo de alcohol en la conducción. Dentro de la química clínica y forense, existen multitud de metodologías caracterizadas por su exactitud y precisión en la determinación del contenido alcohólico de una muestra real como por ejemplo HPLC [88], cromatografía de gases [89, 90]. Estas técnicas cromatográficas, presentan, no obstante, una serie de desventajas como el alto coste de la instrumentación requerida, largos protocolos de preparación de la muestra, dilatados tiempos de análisis o la nula capacidad de miniaturización, que los hace incompatibles con realizar medidas *in situ*. Esto conlleva que en la actualidad el mayor esfuerzo investigador se centre en el desarrollo de dispositivos sensores y biosensores que suplan las desventajas de la instrumentación clásica,

a la vez que son capaces de determinar el nivel de alcohol de una muestra con la suficiente precisión. Así, dentro de los numerosos métodos de análisis que existen, la utilización de biosensores enzimáticos son los que proporcionan mejores resultados, ya que emplean una instrumentación sencilla y proporcionan alta sensibilidad y selectividad y tiempos de respuesta muy breves.

## **8. Utilización de nanomateriales en el desarrollo de plataformas sensoras y biosensoras.**

La Comisión Europea, a través de su comité científico, recomienda definir los nanomateriales como aquellos que debido a su pequeño tamaño presentan propiedades físicoquímicas diferentes a la del material macroscópico. Dimensionalmente se engloba dicha definición a aquel que posea unas dimensiones inferiores a 100 nm, en al menos una dimensión espacial. Las excepcionales propiedades físicoquímicas de los nanomateriales están causadas fundamentalmente por dos motivos. En primer lugar, presentan una mayor área superficial cuando se comparan con el mismo material en escala macrométrica. Esto hace, que el material sea químicamente más reactivo y al final esto afectará a sus propiedades físicoquímicas. En segundo lugar, los efectos cuánticos, pueden llegar a dominar el comportamiento de la materia en la nanoescala, afectando a sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas.

Los nanomateriales que más se han utilizado en el desarrollo de dispositivos sensores y biosensores son los nanotubos de carbono (CNTs) descubiertos por Ijima, las nanopartículas metálicas y el grafeno. Los nanomateriales se pueden clasificar en función de diferentes parámetros como por ejemplo su naturaleza, cristalinidad, composición [91]. Sin embargo, la clasificación más extendida dentro

de la comunidad científica, es la realizada en base a su dimensionalidad.

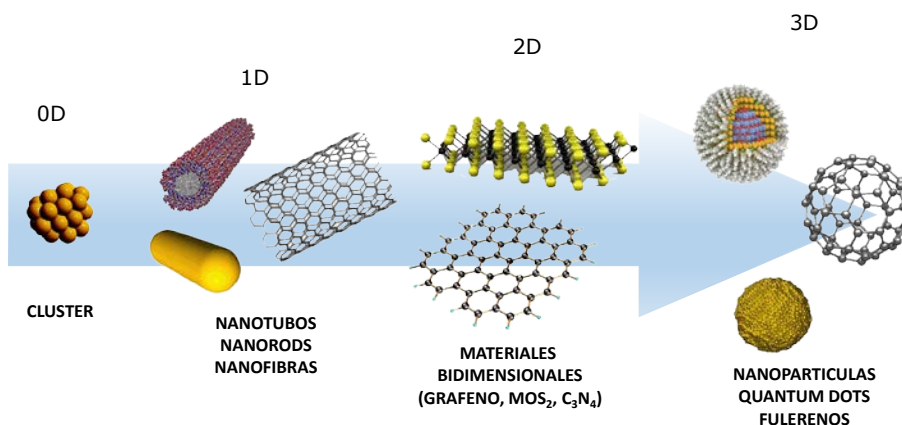


Fig. 9. Diagrama de los nanomateriales existentes en función de su dimensionalidad.

En el presente trabajo la utilización de nanomateriales se circunscribe a las nanopartículas de oro y, fundamentalmente, el grafeno oxidado.

### 8.1. Grafeno.

El grafeno es un nanomaterial que posee una estructura laminar plana, en sentido estricto de un átomo de grosor, compuesta por átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  densamente empaquetados mediante enlace covalente en una red cristalina con forma de panel de abeja. Las extraordinarias propiedades electrónicas del grafeno: su alta movilidad electrónica  $2 \cdot 10^5 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 100 veces mayor que el silicio; y su baja resistividad  $10^{-6} \Omega \cdot \text{cm}$  [92], hacen que en la actualidad este nanomaterial esté siendo utilizado como dispositivo electroquímico en el diseño de plataformas sensoras y biosensoras [93]. Las propiedades electrónicas se deben

al solapamiento de la banda de conducción y la banda de valencia en determinados puntos de confluencia (puntos k) de geometría cónica en las proximidades del nivel de Fermi; esto conlleva que los portadores de carga puedan moverse entre ambas bandas como si fueran partículas sin masa. Este hecho junto a la existencia de un efecto Hall cuántico anómalo, donde la corriente toma valores discretos, por lo que se puede medir con facilidad, hacen del grafeno un nanomaterial apropiado para el diseño y la fabricación de dispositivos sensores.

El grafeno oxidado, por el contrario, posee un amplio abanico de funcionalizaciones que introducen átomos de oxígeno en la estructura; tales como epóxidos y alcoholes en los planos basales, mientras que aldehídos y ácidos carboxílicos, se encuentran mayoritariamente en los extremos de las láminas de grafeno.

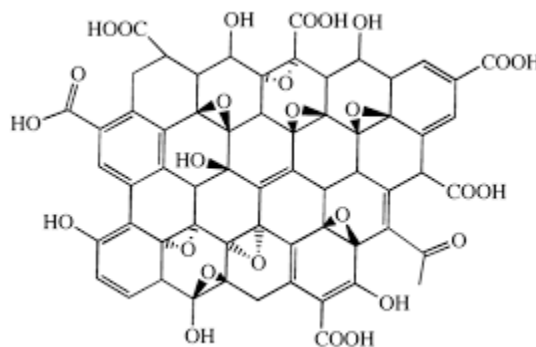


Fig. 10. Simulación de la estructura de una lámina de grafeno oxidado.

La oxidación del grafeno disminuye la movilidad electrónica puesto que rompe la hibridación  $sp^2$  continua de la estructura, lo que provoca la existencia del fenómeno de localización de Anderson que conlleva el confinamiento de los electrones en los defectos del material, adicionalmente implica la ausencia de solapamiento entre la banda de conducción y de valencia, ambos fenómenos tienen como

consecuencia directa una disminución significativa en la movilidad electrónica de los portadores de carga y por tanto una menor conductividad del material [94], por este motivo el grafeno oxidado, hasta la actualidad, se ha utilizado casi exclusivamente como precursor sintético de grafeno reducido. Sin embargo, la utilización de este nanomaterial presenta una serie de ventajas como una elevada reactividad química gracias a los grupos funcionales que pueblan su estructura y que pueden ser utilizados para modificar su superficie con compuestos de interés tanto químico como biológico por ejemplo enzimas, ADN, etc; además es un material que presenta una relación superficie-volumen muy elevada por tanto permite modificar su superficie con una gran cantidad de analito y consecuentemente puede provocar una amplificación de la señal instrumental; por último, gracias a la presencia de grupos funcionales oxigenados se dispersa fácilmente en agua y en otras matrices, por lo que es compatible con la utilización de moléculas biológicas de interés como células, enzimas y ADN. Por todo ello, el grafeno oxidado puede considerarse como un nanomaterial muy prometedor para el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos [95]. En virtud de sus propiedades, la tendencia de uso está cambiando rápidamente, impulsada por sus múltiples aplicaciones como transportador de fármacos [96], agente de contraste [97], celda de combustible [98] o supercondensador [99].

Respecto a la interacción del grafeno reducido con sales de diazonio, dadas las extraordinarias propiedades electrónicas del grafeno reducido, Haddon y Strano han descrito incluso el procedimiento de electroinjerto de sales de diazonio sin la necesidad de aplicar un potencial eléctrico a la superficie [100, 101]. Este procedimiento, no obstante, adolece de dos inconvenientes, en primer lugar la necesidad de trabajar con disolventes orgánicos donde el grafeno reducido es soluble y en segundo lugar, el tiempo

necesario para modificar la superficie mediante electroinjerto espontáneo de la sal de diazonio en el mejor de los casos, no es inferior a 80 minutos [102]. La formación de enlaces covalentes mediante la química de las sales de diazonio promueve dos efectos contrapuestos y competitivos en el grafeno: en primer lugar, el efecto de retrodonación de la molécula al grafeno conlleva un aumento importante en la densidad de los portadores de carga, pese a introducir un defecto en el material. Por otro lado, la creación de defectos se relaciona con el incremento de la probabilidad de dispersión (scattering) de los portadores de carga, lo que disminuye la movilidad de estos [103]. Cuando la modificación se lleva a cabo con alto número de moléculas, como ocurre en el electroinjerto, el primer efecto predomina sobre el segundo, lográndose un aumento de la conductividad eléctrica [104].

Durante los últimos cinco años se han publicado varios trabajos donde se describe la interacción de diferentes sales de diazonio y grafeno oxidado [105-108]. Sin embargo, la reducción electroquímica de sales de diazonio sobre grafeno oxidado no ha sido descrita hasta la fecha. Es, por tanto, interesante avanzar en el estudio y la caracterización de dispositivos fabricados mediante el electroinjerto sobre nanomateriales como el grafeno oxidado, dadas las potencialidades que presentan. Así por ejemplo, Karpuzov y Long han descrito que las propiedades del grafeno oxidado pueden utilizarse en la fabricación de dispositivos sensores en la electrocatálisis de NADH obteniendo mejores resultados que al utilizar grafeno reducido [109].



## **8.2.Nanopartículas metálicas.**

La investigación acerca de las propiedades y aplicaciones de las nanopartículas dentro del marco de la bio y nanotecnología, representa uno de los campos más punteros y con mayores perspectivas de futuro dentro de la ciencia actual, puesto que permiten aunar las propiedades de las nanopartículas, con el reconocimiento selectivo y las propiedades catalíticas de las enzimas [110-112]. La utilización de nanopartículas en la construcción de dispositivos (bio)sensores está experimentando un crecimiento exponencial debido al efecto causado en primer lugar, por su alta relación superficie-volumen, que las capacita para incorporar una gran cantidad de elemento de reconocimiento o de analito, consiguiendo una amplificación de la señal analítica y en segundo lugar por que incrementa significativamente la transferencia electrónica del dispositivo electroquímico o mejora las propiedades óptoelectronicas en el dispositivo óptico.

El mayor reto al que se enfrenta la electrónica biomolecular actual es mejorar la transferencia electrónica entre biomolécula e interfase electródica [113]. Ésta se explica gracias al modelo teórico propuesto por Marcus y Hush [114], el cual ha demostrado una valiosa contribución en la comprensión de la transferencia electrónica (ET) en sistemas inorgánicos, organometálicos y biológicos complejos [115]. Los centros con actividad redox de las metaloproteínas juegan un papel fundamental en procesos bioquímicos como la fotosíntesis y la respiración celular, en este sentido establecer una conexión con la proteína mediante la formación de bioconjugados puede lograr no solo orientar de manera adecuada la proteína respecto a la superficie del transductor, sino también incrementar la transferencia electrónica y por tanto aumentar significativamente la eficiencia de catálisis. El principal inconveniente que surge al intentar establecer una

conectividad entre ambas estructuras es la fragilidad que conlleva trabajar con dispositivos que implican enzimas, debido a que la desnaturalización de su estructura proteica tiene como consecuencia la consiguiente pérdida total de la actividad catalítica. Una de las soluciones más novedosas e interesantes para mejorar la transferencia electrónica sin desnaturalizar la estructura proteica, está basada en modificar la superficie de las nanopartículas con compuestos que presenten grupos funcionales, como amina, alcohol o ácido carboxílico, tales que permitan enlazarse a la enzima, o a su centro activo, por medio de interacciones bien electrostáticas bien covalentes pudiendo así actuar como puentes entre la superficie electródica y la proteína. Willner y colaboradores, en 2003, demostraron que la incorporación de una nanopartícula de pequeño diámetro ( $\sim 1.4$  nm) podía mejorar la transferencia electrónica de la enzima Glucosa Oxidasa respecto a su sustrato natural [116] (Figura 11. A). Asimismo, Ulstrup, Schiffrin y colaboradores basándose en un trabajo previo [117], lograron conectar nanopartículas de oro sintetizadas mediante el método Brust-Schiffrin (3-4 nm diámetro) y recubiertas mediante diferentes ligandos tiol, con la enzima citocromo c sobre una superficie electródica de oro logrando una notable mejora en la transferencia electrónica, de entre 3 y 25 veces en función del tiol utilizado [118] (Figura 11.B).

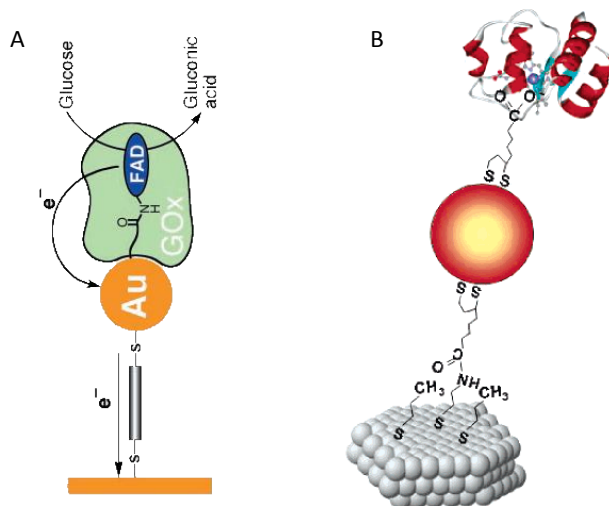


Fig. 11. Esquema de la interacción entre nanopartícula y enzima propuesta por Willner y cols [102] y Ulstrup y cols [104].

En la actualidad, la incorporación de nanomateriales en el diseño y construcción de dispositivos sensores y biosensores, pese a que es una metodología reciente y se encuentra aún en fase de desarrollo, esta sufriendo un rápido crecimiento gracias a sus propiedades (bio)catalíticas y de inmovilización. Con la finalidad de aprovechar las propiedades que aportan los nanomateriales a la construcción de dispositivos biosensores, es necesario promover un contacto más íntimo entre biomolécula y nanomaterial sin perder la actividad del elemento biológico. En este sentido, en los últimos años, se ha descrito que la utilización de bioconjugados biomolécula-nanomaterial logran mejorar el evento de reconocimiento biomolecular analito-fase sensora [119] lo que se traduce en cinéticas de transferencia más rápidas, un incremento en la estabilidad de la plataforma biosensora obtenida [120] y una orientación adecuada la enzima sobre la superficie del transductor, de modo que se optimiza la respuesta biocatalítica.

La formación de bioconjugados, por tanto, representa una novedosa estrategia para desarrollar aplicaciones complejas en el campo de la biotecnología como por ejemplo el análisis multiplexado de analitos utilizando bioconjugados formados por puntos cuánticos (o quantum dots) y proteínas [121], la utilización de bioconjugados de grafeno en la construcción de narices bioelectrónicas [122], el transporte de fármacos mediante bioconjugados RNA aptámero y nanopartícula [123].

Hasta hace unos años la utilización de biosensores como metodología analítica no poseía una implantación real en laboratorios de análisis en áreas tales como el medio ambiente, el control alimentario y la atención de la salud. No obstante, gracias a los avances científicos que se están realizando en el diseño y fabricación de estos dispositivos, tales como la miniaturización ó la biocompatibilidad, y al desarrollo de aplicaciones como la monitorización *in situ* de parámetros bioquímicos por medio de biosensores [124-126], esta tendencia empieza a cambiar y pueden vislumbrarse grandes perspectivas de futuro en este campo.



OBJETIVOS

---

PLAN DE TRABAJO



## **1. Objetivos.**

El objetivo principal del presente trabajo es el diseño, desarrollo y caracterización de electrodos modificados con mediadores redox de la familia de las fenotiazinas, fenoxacinas y fenazinas, así como su utilización como plataformas electroquímicas sensoras y biosensoras. Para ello, se propone la utilización de una metodología novedosa como es el procedimiento de electroinjerto de sales de diazonio, que permitirá unir estos mediadores redox a la superficie electródica, dando lugar a modificaciones electródicas estables y robustas. Tras estudiar las propiedades electrocatalíticas y (bio)sensoras de las plataformas desarrolladas, se evaluará la influencia y ventajas que conlleva la incorporación de nanomateriales de última generación en la fabricación de dichas plataformas.

Este objetivo general comprende una serie de objetivos parciales centrados en:

1. Llevar a cabo el electroinjerto de los mediadores redox seleccionados sobre la superficie de distintos materiales utilizados como electrodos.
2. Caracterizar electroquímicamente la reacción de electroinjerto y los electrodos modificados resultantes.
3. Estudiar las propiedades catalíticas frente a la oxidación de NADH de los electrodos modificados obtenidos.
4. Desarrollar un sensor electroquímico de NADH.
5. Estudiar el procedimiento de electroinjerto sobre un electrodo modificado con grafeno oxidado, caracterizar



el dispositivo obtenido y evaluar su influencia en la respuesta del sensor de NADH.

6. Desarrollar un biosensor de etanol basado en la inmovilización de la enzima alcohol deshidrogenasa en la plataforma sensora desarrollada.
7. Evaluar la utilización de bioconjugados alcohol deshidrogenasa-nanopartícula de oro en el desarrollo del biosensor.

## **2. Plan de trabajo.**

Para alcanzar los objetivos planteados, ha sido necesario llevar a cabo el siguiente plan de trabajo.

1. Seleccionar los compuestos que contengan una amina aromática primaria en su estructura, por tanto son susceptibles de sufrir reacción de diazotación, y presenten propiedades como mediadores redox. En particular, se considerarán compuestos colorantes de la familia de las fenotiazinas (Azure A y Tionina), fenoxazinas (Azul Nilo) y fenazinas (el Rojo Neutro).
2. Estudiar la modificación de diversos materiales utilizados como soportes electródicos mediante el procedimiento de electroinjerto de Azure A. Caracterizar las películas electroactivas obtenidas mediante diferentes técnicas con el objetivo de evaluar su estructura, estabilidad y propiedades electrocatalíticas.

3. Diseñar y desarrollar un soporte electródico híbrido (grafeno oxidado/oro) que permita estudiar el procedimiento de electroinjerto sobre nanomateriales de última generación. Caracterizar exhaustivamente la naturaleza y propiedades del dispositivo híbrido obtenido y evaluar sus propiedades electrocatalíticas frente a la oxidación de NADH.
4. En base a las propiedades electrocatalíticas observadas, desarrollar plataformas sensoras de NADH.
5. Optimizar los parámetros analíticos de los sensores desarrollados para la determinación cuantitativa de NADH.
6. Desarrollar un dispositivo biosensor basado en una enzima deshidrogenasa la Alcohol Deshidrogenasa (ADH). Estudiar la influencia de nanopartículas de oro en la construcción de dicho dispositivo y evaluar su respuesta biocatalítica.
7. Optimizar la respuesta del biosensor desarrollado para la determinación cuantitativa de etanol.



# CAPÍTULO II

---

## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Reactivos y disoluciones.

### 1.1. Reactivos.

Los reactivos comerciales que han sido utilizados en el desarrollo del presente trabajo investigador presentaban, al menos, la calidad de reactivo analítico.

<b>REACTIVO</b>	<b>PROVEEDOR</b>
<i>Fosfato Sódico Monobásico</i>	<i>Fluka</i>
<i>Fosfato Sódico Dibásico</i>	<i>Riedel de Haën</i>
<i>Ácido Acético Glacial</i>	<i>Fluka</i>
<i>Acetato Sódico</i>	
<i>Ácido Clorhídrico</i>	
<i>Ácido Sulfúrico</i>	
<i>Hidróxido Sódico</i>	
<i>Cloruro de N',N'-Dimetil-3,7-diamino-5-fenotiazina (Azure A)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Cloruro de 3-Amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (Rojo Neutro)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Acetato de 3,7-Diamino-5-fenotiazina (Tionina)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Cloruro de 5-Amino-9-(dietilamino)benzo[a]-7- fenoxazina (Azul Nilo)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Nitrito Sódico</i>	<i>Riedel de Haën</i>
<i>β Nicotinamida Adenin Dinucleotido Reducido(NADH)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>β Nicotinamida Adenin Dinucleotido Oxidado(NAD<sup>+</sup>)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Dihidrocloruro de Cistamina</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>N-Hidroxisuccinimida</i>	<i>Sigma Aldrich</i>

<i>Ferrocianuro potásico</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Etanol (UV-Vis, HPLC Grade)</i>	
<i>Ácido Tetracloroaurico</i>	
<i>Bromuro de Tetraoctilamonio</i>	<i>Alfa Aesar</i>
<i>6-Mercapto-1-hexanol</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Quitosano (HMW)</i>	<i>Sigma Aldrich</i>
<i>Ácido Tióctico</i>	<i>Sigma Aldrich</i>

El agua utilizada para llevar a cabo todas las preparaciones ha sido purificada a través de un sistema de agua ultrapura **Direct Q-3 UV de Millipore**, que proporciona valores de resistividad de  $18.2 \text{ m}\Omega/\text{cm}^2$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **1.2. Disoluciones.**

Las disoluciones tampón fosfato 0.1M han sido preparadas a partir de las especies del sistema fosfórico-fosfato correspondientes al pH de trabajo deseado. El valor de pH se ha ajustado cuando ha sido necesario con disoluciones concentradas de HCl o NaOH. Las disoluciones tampón acético/acetato 0.1M han sido preparadas a partir de ácido acético glacial y acetato sódico ajustadas a pH 4.8 utilizando una disolución concentrada de NaOH.

La disolución de ferrocianuro potásico utilizada para las medidas de microscopia de barrido electroquímico (SECM), se ha preparado disolviendo la cantidad necesaria de ferrocianuro potásico para una concentración 1mM en tampón fosfato pH 7 (0.1M) que contenía cloruro potásico (KCl) en una concentración (0.1 M).

La fabricación del polímero de atrapamiento utilizado como recubrimiento del biosensor, se preparó disolviendo 1 mg de quitosano en 100 mL de ácido acético al 3% en agua destilada. El

medio ácido fue necesario dado que el quitosano a valores de pH superiores a 5 es insoluble. Posteriormente se sonica durante 10 minutos para disolverlo completamente y se utiliza inmediatamente tras su preparación.

## **2. Procedimientos.**

### **2.1. Síntesis de Grafeno Oxidado.**

El grafeno empleado se sintetizó en nuestro grupo de investigación mediante una modificación del método de Hummers [127], y se caracterizó mediante diversas técnicas (AFM, XPS, Raman, entre otras). Determinándose inequívocamente que el material de partida utilizado es grafeno oxidado. La concentración de la disolución de partida ha sido de 1.0 mg / mL en tampón fosfato 0.1 M ajustado a pH 7.0.

Previa a su utilización, la disolución de grafeno oxidado de partida, se sonica durante al menos 60 minutos. De este modo se consiguen separar los agregados formados por la interacción entre láminas de grafeno oxidado obteniendo una disolución homogénea de color marrón oscuro.

### **2.2. Síntesis de Nanopartículas de Oro.**

Las nanopartículas de oro han sido sintetizadas a través del método Brust-Schiffrin [117]. Para ello, se disuelve 0.07 gr de  $\text{HAuCl}_4$  en 6 mL de agua destilada. Por otra parte, se prepara una disolución de Bromuro de Tetraoctilamonio (TOABr) en tolueno. Ambas disoluciones se añaden a un matraz, bajo agitación durante 1h. De este modo, y gracias al agente de transferencia de fase (TOABr), el



tetracloroaurato se transfiere a la fase orgánica. Posteriormente, el matraz se dispone sobre un baño de hielo y se adiciona el tiol funcionalizado bien mercaptohexanol (MCH-AuNPs) bien ácido tióctico (TOA-AuNPs), que recubrirá la superficie de las nanopartículas, dejando que se complete la reacción un tiempo de 30 minutos. Por último, se añade al matraz de reacción una disolución de  $\text{NaBH}_4$  en agua destilada, adquiriendo la mezcla un color marrón oscuro, y se mantiene bajo agitación durante 3h.

Finalmente el producto obtenido se centrifuga, se extrae el disolvente con cuidado y se lava con una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 M), repitiéndose este proceso varias veces y finalmente se disuelven en etanol (MCH-AuNPs) o en agua destilada (TOA-AuNPs).

### **2.3. Activación de superficies electrónicas.**

#### **2.3.1. Activación de los electrodos serigrafados de carbono.**

Los electrodos se activan en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M mediante la aplicación de 5 barridos cíclicos sucesivos a  $100 \text{ mVs}^{-1}$  entre +0.5 y -1.0 V. A continuación, se aclara con agua destilada y se sumerge en una disolución 25mM de HCl, aplicándose 5 barridos de potencial sucesivos en las mismas condiciones a las descritas anteriormente.

#### **2.3.2. Activación de superficies de oro.**

El tratamiento previo de las superficies de oro, se realiza con el objetivo de obtener superficies lo más reproducible y libre de impurezas posible.

Activación de Electroodos de Oro. Para llevar a cabo su activación, los electrodos se pulen con pasta de diamante 0.1  $\mu\text{m}$  (Buehler) durante un minuto en pulidora. Se aclaran con agua destilada y se sonicen en etanol durante cinco minutos para retirar partículas de pasta de pulido que hayan quedado adsorbidas sobre la superficie del electrodo.

Posteriormente, el electrodo de oro se activa electroquímicamente en disolución desoxigenada de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M, aplicando diez barridos cíclicos sucesivos de potencial entre -0.25 y +1.5 V a  $100 \text{ mVs}^{-1}$ [128]. El área microscópica de los electrodos se determina por integración del pico catódico de reducción del óxido en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M usando un factor de conversión de  $482 \mu\text{C cm}^{-2}$  [129].

Activación de Placas de Oro. La activación de las placas se realiza, según especifica el fabricante, mediante el "annealing" térmico de la lámina superior de oro, con este tratamiento se obtienen terrazas con estructura (111). El enfriamiento de la placa se realiza a temperatura ambiente con el objetivo de preservar la estructura obtenida.

Activación de Cristales QCM de Oro. Los cristales se activan sumergiéndolos en disolución piraña  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$  (3:1) durante un minuto (Precaución: La disolución piraña es altamente reactiva, por lo que debe manejarse con cuidado, utilizando los equipos de protección adecuados). Posteriormente se aclaran con abundante agua destilada y se secan bajo una corriente de nitrógeno.

## 2.4. Reacción de diazotación de colorantes.

La metodología utilizada para llevar a cabo la reacción de diazotación de la molécula colorante ha sido la siguiente. A un volumen de una disolución de colorante preparada en HCl 0.2 M se adiciona el mismo volumen de una disolución equimolar de Nitrito Sódico ( $\text{NaNO}_2$ ) en agua destilada y se homogeniza la muestra. Inmediatamente la mezcla se introduce en un baño de hielo durante diez minutos, ya que la reacción de diazotación es exotérmica, con el objetivo de que la formación del diazoderivado sea completa. La metodología a seguir en el caso de la reacción de diazotación de la fenotiazina Azure A sería el siguiente.

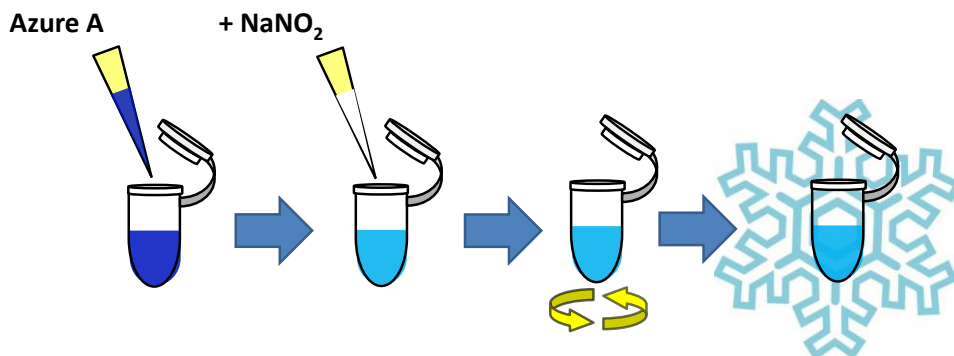


Fig. 12. Esquema del procedimiento de diazotación del Azure A.

La reacción de diazotación transcurre siguiendo un mecanismo de reacción como el que se muestra en el siguiente esquema (figura 13).

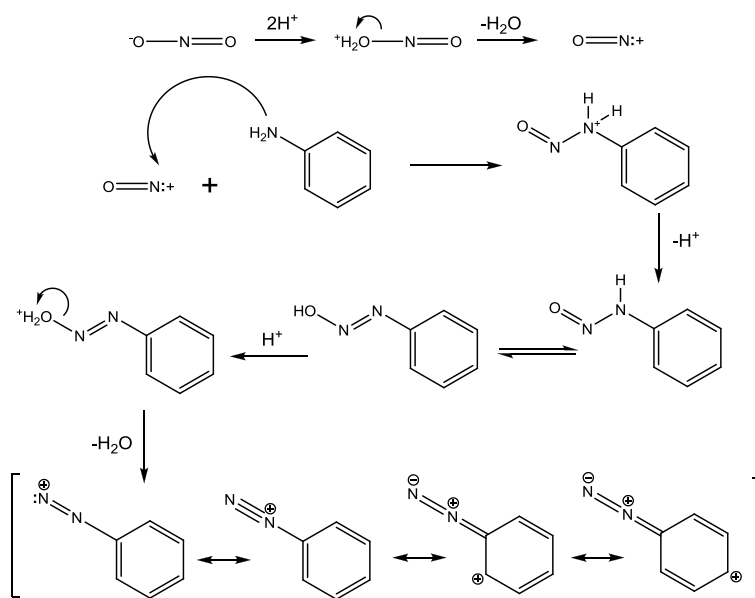


Fig. 13. Esquema del mecanismo de la reacción de formación de la sal de diazonio.

La formación de diazoderivados tiene lugar a través de ataque nucleófilo de la amina aromática al catión nitroso generado *in situ*, gracias a la reacción de nitrito sódico en medio fuertemente ácido. El posterior ataque del catión nitroso a la amina aromática da lugar a una forma ceto-azo, en equilibrio tautomérico con su forma enol-azo, la posterior pérdida de una molécula de agua de la forma enol rinde cuatro formas resonantes, de las cuales aquella formada por el grupo diazo ( $\text{Ar}-\text{N}^+\equiv\text{N}$ ) es la que participa mayoritariamente en la estructura final. La especificidad de la reacción hacia aminas primarias aromáticas se debe a la estabilización que proporciona la deslocalización de la carga sobre el anillo aromático.

Las sales de diazonio son estables en medios acuosos a pH ácido, su estabilidad disminuye al aumentar el pH hasta un máximo de pH 3. A pH neutro y básico se produce la formación de los

diazohidróxidos ( $\text{Ar-N=N-OH}$ ) y diazoatos ( $\text{Ar-N=N-O}^-$ ). Los diazohidróxidos son inestables incluso en pH neutro, y sufren una rápida transformación a la forma de diazoatos. Las sales de diazonio son también estables y solubles en medios orgánicos no acuosos como el acetonitrilo, pudiéndose incluso realizar la reacción de diazotación en este medio si se adiciona nitrito de terc-butilo.

## **2.5. Modificación de superficies electródicas con sales de diazonio.**

### **2.5.1. Electroodos serigrafiados de carbono.**

Una vez activados, los electroodos se sumergen en la disolución resultante de la reacción de diazotación y se aplican diez barridos cíclicos de potencial entre +0.5 y -0.7 V a  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . A continuación, se aclara con agua destilada y se realiza la etapa de acondicionamiento, para lo cual se aplican 20 ciclos de potencial entre -0.4 y +0.6 V a  $100 \text{ mVs}^{-1}$  en tampón fosfato pH 7 (0.1M) y se aclaran con agua destilada, con el fin de eliminar moléculas de colorante que hayan podido quedar adsorbidas sobre la superficie del electrodo. Por último, en caso de no utilizarse inmediatamente se almacenan en ausencia de luz.

### **2.5.2. Electroodos de oro.**

El electrodo, previamente activado, se sumerge en la disolución resultante de la reacción de diazotación de Azure A, y se aplican diez barridos cíclicos de potencial entre +0.50 y -0.25 V a una velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Una vez modificado, el electrodo se aclara con agua y se almacenan siguiendo las condiciones anteriormente descritas.

Las superficies de oro modificadas con películas de grafeno oxidado, se electroinjeratan con Azure A siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente; aplicando barridos cíclicos de potencial y ampliando la ventana de potencial entre +0.5 y -0.7 V. Los electrodos obtenidos se aclaran con agua destilada y se almacenan en las mismas condiciones.

## 2.6. Electrodos de oro modificados con películas de grafeno oxidado.

Una vez activados las superficies de oro se sumergen en una disolución de cistamina 1mM en etanol durante 24 horas con el objetivo de formar la monocapa autoensamblada (SAM). A continuación, se aclara con etanol, se seca bajo corriente de nitrógeno y se modifica con una disolución de concentración 1mM de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 1mM de N-Hidroxisuccinimida (NHS) y 0.10 mg/mL de disolución de grafeno oxidado, preparada en agua destilada tras lo cual se homogeniza la muestra. En la figura 14 se esquematiza este último procedimiento.

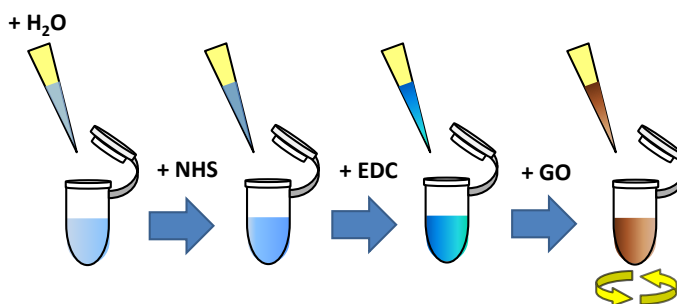


Fig. 14. Esquema de la preparación de la disolución de grafeno oxidado/EDC/NHS utilizada para modificar los electrodos de oro.

Mediante esta reacción se produce la formación de un grupo amida entre la amina primaria de la monocapa autoensamblada de cistamina y los ácidos carboxílicos presentes en el grafeno oxidado, mediada por la presencia de EDC y NHS a través del mecanismo resumido en la figura 15.

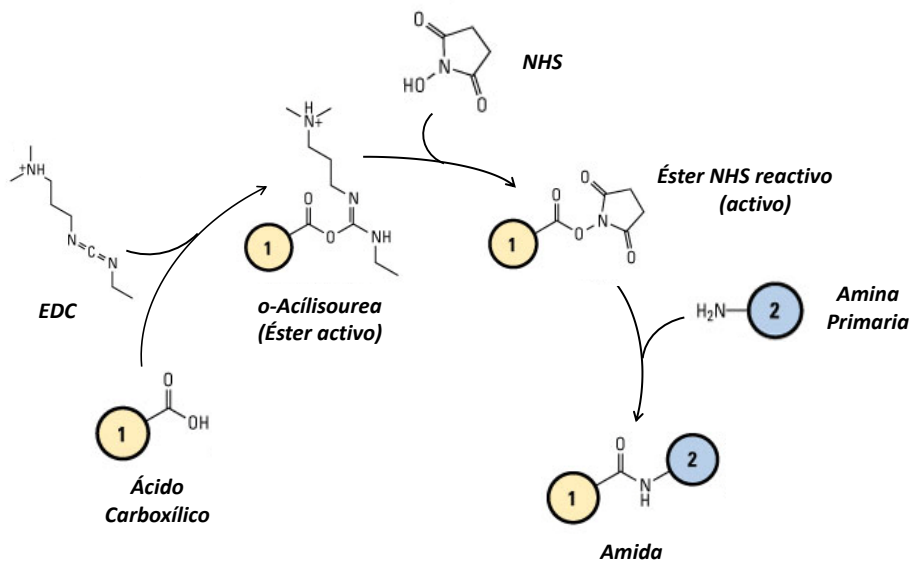


Fig. 15. Esquema de la reacción de entrecruzamiento grafeno oxidado (GO)/EDC/NHS utilizada para modificar los electrodos de oro.

Posteriormente, la superficie modificada se almacena por un periodo de 3 horas a 4°C y posteriormente se aclara tres veces con agua destilada, con el fin de reducir el número de láminas de grafeno oxidado que puedan adsorberse inespecíficamente sobre la superficie del material.

## 2.7. Fabricación del biosensor.

Una vez se ha modificado la superficie del electrodo mediante electroinjerto de Azure A. Tras llevar a cabo el acondicionamiento del electrodo modificado, se añaden 0.5  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de concentración 0.47  $\mu\text{M}$  y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se deposita cuidadosamente la enzima alcohol deshidrogenasa (25 U) sobre la superficie del electrodo de trabajo y se deja almacenar a 4°C durante 1h. Finalmente se cubre con la disolución del polímero quitosano y se almacena a 4°C hasta su uso.

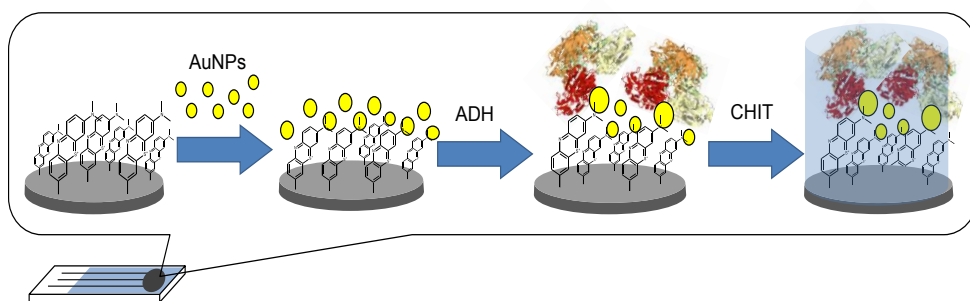


Fig. 16. Esquema de la preparación del biosensor con la enzima alcohol deshidrogenasa.

## 3. Instrumentación.

Las operaciones básicas de laboratorio tales como homogenizaciones y separaciones de muestra se llevaron a cabo en un baño de ultrasonidos **Sonicador Ultrasonic Cleaner** y mediante una **Centrifuga Hettich 320R** provista de un rotor angular, respectivamente. El pulido de los electrodos se realizó con una pulidora automática **Metaserv** de **Buehler**. A continuación se describirá la instrumentación utilizada durante el desarrollo del



presente trabajo, detallando con mayor profundidad aquellas técnicas instrumentales, como la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo y la elipsometría espectroscópica, que habiéndose utilizado en varios capítulos pueden resultar menos conocidas al lector.

Las medidas electroquímicas se han llevado a cabo mediante un **Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT302N** con módulo adicional de **Espectroscopia de Impedancia Electroquímica FRA2** de **EcoChemie**.

**Celda Electroquímica.** Se han utilizado dos tipos de celdas electroquímicas. En caso de utilizar una celda electroquímica de tres electrodos, cuya configuración se muestra en la figura 17, los **electrodos de trabajo** utilizados han sido, o bien un electrodo de oro policristalino o un electrodo de carbón vítreo (CH Instruments), el **electrodo auxiliar** consta de un hilo de platino (99.99% de pureza;  $\phi=0.5\text{mm}$  de Goodfellow) enrollado de alta superficie y **electrodo de referencia** de Ag/AgCl (WPI), en la siguiente configuración.

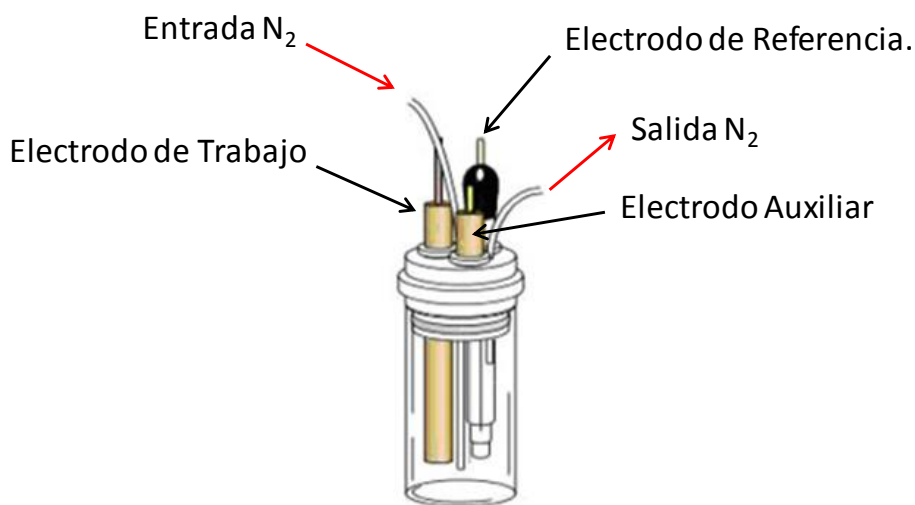


Fig. 17. Esquema de la celda electroquímica de tres electrodos utilizada.

Por otro lado, se han utilizado también electrodos serigrafiados de carbono comerciales (Dropsens) como celdas electroquímicas cuyo **electrodo de trabajo y auxiliar** son tinta de carbono, y el **electrodo de pseudoreferencia** es tinta de plata (Ag).

Las medidas electroquímicas obtenidas mediante la técnica de la **Microbalanza Electroquímica de Cristal de Cuarzo (EQCM)** se han logrado gracias al acoplamiento instrumental de la microbalanza de cristal de cuarzo modelo **SRS QCM 200 Instruments** con el potenciostato de trabajo. Como celda electroquímica se han utilizado cristales de cuarzo recubiertos de una lámina de oro proporcionados por SRS Instruments cuya frecuencia de oscilación es de 5 MHz, corte AT y diámetro de 2.54 cm.

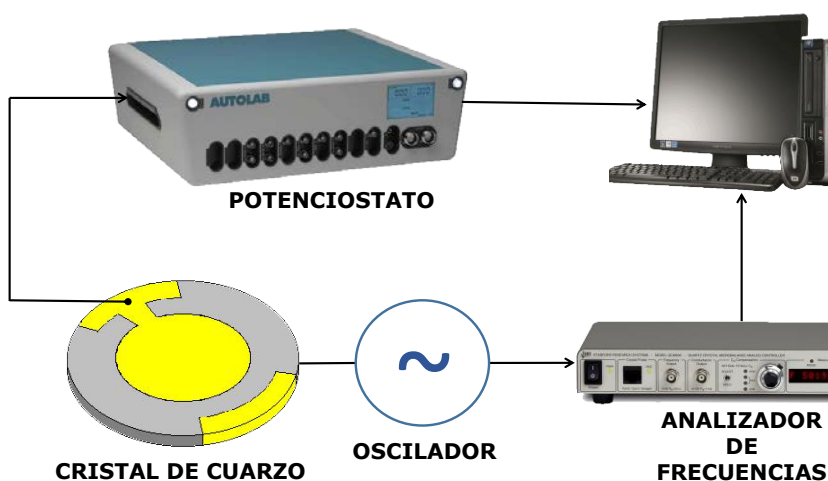


Fig. 18. Esquema de la instrumentación de la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM).

Se utilizó un **Microscopio de Barrido Electroquímico (SECM)** modelo **CHI 900b** para realizar las curvas de aproximación. El microscopio consta de sendos módulos, uno de ellos está constituido por un bipotenciostato, con el que podemos aplicar

potenciales distintos tanto a la punta del microscopio, electrodo de trabajo, como al sustrato. El otro módulo controla la posición de la muestra respecto al electrodo de trabajo gracias a la presencia de un motor y un sistema piezoeléctrico que permite mover la muestra en los ejes x, y y z. La celda electroquímica utilizada posee la misma configuración de tres electrodos que la descrita anteriormente. Siendo el electrodo de trabajo un ultramicroelectrodo de platino (CH Instruments), el electrodo auxiliar un hilo de platino y el electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl.

Las curvas de aproximación de los electrodos modificados con el mediador redox se registraron para diferentes potenciales punta-sustrato. Los potenciales del sustrato aplicados variaron entre +0.0 V y -0.4 V; mientras que los potenciales aplicados a la punta del ultramicroelectrodo tomaron valores desde +0.1 V a -0.4 V. Se escogió la sonda electroquímica ferrocianuro potásico,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ; para lograr el feedback punta-sustrato requerido en las medidas experimentales. Para obtener dichas curvas, en primer lugar se realizó una aproximación punta/sustrato a una velocidad relativamente alta (100  $\mu\text{m/s}$ ) hasta una distancia de 10  $\mu\text{m}$  de la superficie. Posteriormente, se registraron las curvas de aproximación a una velocidad de 5  $\mu\text{m/s}$ .

Para llevar a cabo las medidas de microscopía descritas en la presente tesis, se han utilizado placas de oro suministradas por Arrandee. El material base es un vidrio borosilicato cuyo espesor se estima cercano a 0.7 mm, recubierto de una capa de cromo de aproximadamente 2.5 nm sobre la que se deposita una lámina de oro de 250 nm.

Las medidas de **Microscopía Electrónica de Barrido-Emisión de Campo (FE-SEM)** con un detector VCD se han llevado

a cabo en el Instituto CSIC de Materiales (ICMM-CSIC) utilizando un equipo **FEI Nova NANOSEM 230**.

Las medidas obtenidas mediante **Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)** se realizaron en el Instituto CSIC de Materiales (ICMM-CSIC) utilizando para ello un modelo **Nanoscope IIIa** de **Veeco** en modo intermitente bajo condiciones ambientales. Se utilizaron cantiléver construidos en silicio (Veeco), que presentaban constantes de fuerza de diferentes rangos: 1-3 N/m, así como de aproximadamente 40 N/m. Las imágenes fueron obtenidas utilizando diferentes cantiléver, con el fin de asegurarnos que las estructuras observadas no se debían a artefactos de la punta.

Asimismo, se ha utilizado un equipo de **Microscopía Raman** para ello un microscopio **Nikon** se ha acoplado con un **espectrógrafo Shamrock 300** que incluía una **cámara CCD** modelo **Newton 940**, ambos de **Andor Instruments**. La fuente laser utilizada ha sido un **láser de He-Ne** de **Thorlabs** que opera a 633 nm (rojo). El haz laser en primer lugar se encuentra con un filtro notch encargado de eliminar la señal Rayleigh, que podría enmascarar la señal Raman. Posteriormente, un espejo dicróico (beam splitter) se encarga de establecer una trayectoria bidireccional excitación/colección a la muestra debido presenta una gran reflexión a la longitud de onda del haz laser junto con una gran transmisión de en el rango del espectro Raman. Finalmente, el haz dispersado por la muestra llega al espectrógrafo atravesando una ranura y mediante un software específico aporta información analítica de utilidad.

Las medidas de **microscopia electrónica de transmisión (TEM)**, se realizaron en el instituto de catálisis y petroquímica del CSIC mediante un microscopio **TEM/STEM JEOL 2100F**, que opera a 200KV con un cañón de emisión de campo (FEG) para lo que se obtiene una resolución de punto de 0.19 nm. El equipo lleva acoplado

un **detector EDX** (INCA x-sight de Oxford Instruments), lo que le permite la posibilidad de análisis químico semicuantitativo. Al estar incorporada una unidad STEM, pueden adquirirse imágenes de contraste z (**HAADF**), así como la posibilidad de obtener análisis químicos de zonas de unos pocos nanómetros.

Las medidas elipsométricas de reflexión externa se han realizado utilizando un **Elipsómetro Espectroscópico UVISEL Jobin Yvon** cuya fuente de radiación es una lámpara de arco de xenón, que cubre el rango UV-Vis y parte del IR cercano.

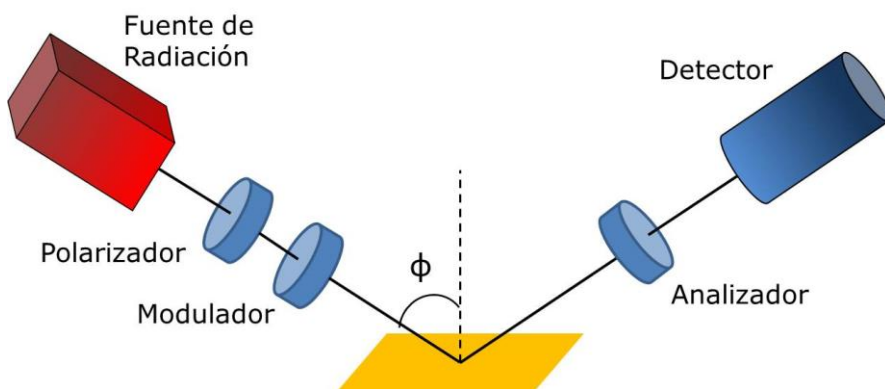


Fig. 19. Esquema de un elipsómetro espectroscópico de reflexión.

El haz de luz transmitido se encuentra con un polarizador y con un modulador de fase a 50 KHz; con ello el estado de polarización del haz incidente es modulado con un periodo igual a 1/50 s. La luz reflejada por la muestra entra en el analizador, que posee un segundo polarizador y un iris de entrada; siendo ésta transmitida finalmente a un monocromador. A la salida del monocromador, la luz es detectada por un fotomultiplicador y es tratada para obtener los parámetros elipsométricos.

Con el objetivo de eliminar el efecto del disolvente, proveniente de la modificación, que haya podido quedar retenido en los intersticios de la película y pudiera interferir en las medidas elipsométricas; las placas de oro, previamente a su medida, han sido almacenadas en desecador durante 48 horas. Las medidas realizadas mediante elipsometría de reflexión se llevaron a cabo manteniendo constante el ángulo incidente a  $75^\circ$  respecto a la horizontal. Para dicho ángulo, el haz focalizado presentaba una estructura oval, cuya área se corresponde con  $2.5 \times 8.0 \text{ mm}^2$ . Los parámetros índice de refracción ( $n$ ) y coeficiente de extinción ( $\kappa$ ), necesarios para calcular tanto el coeficiente de extinción real ( $\epsilon_r$ ), como el imaginario ( $\epsilon_i$ ) del grafeno oxidado; se obtuvieron del trabajo realizado por Wang [130]. Los parámetros elipsométricos  $\psi$  y  $\Delta$  necesarios para estimar el espesor de los recubrimientos superficiales se adquirieron en el rango espectral de 2.5 a 4.5 eV.

Los estudios espectrofotométricos se han realizado utilizando un **Espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700 de Shimadzu** de doble haz, cuyas fuentes de radiación han sido una lámpara de deuterio y una lámpara de halógeno. Las cubetas, construidas en cuarzo, poseen un paso óptico de 1 cm.

Las medidas de **Espectroscopía IR-FT** se han llevado a cabo por el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI), utilizando un **espectrómetro FT-IR de Bruker**.

Las medidas de **Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF)** se han llevado a cabo por el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI), utilizando un **espectrómetro de TXRF S2 PicoFox de Bruker**.

#### 4. Cálculo de parámetros y constantes de interés.

##### 4.1. Cálculo del recubrimiento superficial del material depositado sobre la superficie electródica.

El recubrimiento superficial del material depositado sobre la superficie electródica se ha estimado a partir de la integración del área de pico, tanto anódico como catódico, de los correspondientes voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados con la sal de diazonio y medidos en electrolito soporte. Dicho recubrimiento ha sido obtenido de la expresión (10).

$$\Gamma = Q/n \cdot FA \quad (10)$$

Siendo **Q** la carga asociada a la integración del pico anódico o catódico (C), **n** el número de electrones implicados en el proceso, **F** la constante de Faraday (C/mol) y **A** el área geométrica del electrodo de trabajo (cm<sup>2</sup>).

##### 4.2. Cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga.

La constante heterogénea de transferencia de carga (**k<sub>s</sub>**) entre los mediadores redox inmovilizados y la superficie electródica se ha calculado utilizando el método descrito por Laviron [131]. Este establece que cuando la diferencia de potencial de pico anódico y catódico supera el criterio de 200/n mV, es posible calcular el coeficiente de transferencia de carga (**α**) mediante las ecuaciones (11) y (12), así como la constante heterogénea de transferencia de carga (**k<sub>s</sub>**) para el sistema sometido a estudio, utilizando para ello la ecuación (13).

$$E_{pa} = E^{0'} + \frac{2.3 RT}{(1-\alpha)nF} \cdot \log v \quad (11)$$

$$E_{pc} = E^{0'} - \frac{2.3 RT}{\alpha nF} \cdot \log v \quad (12)$$

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{nF\Delta E_p \alpha(1-\alpha)}{2.3RT} \quad (13)$$

El coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ) puede ser calculado gráficamente. Para ello, en primer lugar se representa el potencial de pico anódico y catódico frente al logaritmo de la velocidad de barrido, obteniéndose dos curvas asintóticas respecto al potencial formal del sistema. Cuando se supera el valor propuesto por Laviron de  $200/n$ , de la intersección de las pendientes de las rectas con el potencial formal se obtiene el coeficiente  $\alpha$  mediante las ecuaciones (2) y (3).

#### 4.3. Cálculo de la constante catalítica mediante el método de Galus.

La constante catalítica se ha estimado mediante cronoamperometría de un solo pulso en función de la concentración de sustrato, según el método descrito por Galus [132]; utilizando para ello la expresión (14).

$$I_{cat}/I_{dif} = \gamma^{1/2} [\pi^{1/2} \operatorname{erf}(\gamma^{1/2}) + \exp(-\gamma)/\gamma^{1/2}] \quad (14)$$

Donde el parámetro  $I_{cat}/I_{dif}$ , se define como la eficiencia catalítica del sensor, expresada como la respuesta del sensor en presencia ( $I_{cat}$ ) y en ausencia ( $I_{dif}$ ) de analito, en nuestro caso NADH;  $\gamma$  es el argumento de la función error (ó erf) y toma valor de  $(k \cdot C_o \cdot t)$ , donde  $C_o$  es la concentración de analito (mol/l) en el seno de la



disolución,  $t$  el tiempo de muestreo (s) y  $k$  la constante catalítica del proceso, en  $M^{-1}\cdot s^{-1}$ . En aquellos casos donde  $Y$  es superior a 2, la función error toma el valor de 1. Por tanto, la ecuación anterior se puede reescribir como (15).

$$I_{cat}/I_{dif} = \pi^{1/2} \gamma^{1/2} = \pi^{1/2} (kC_0t)^{1/2} \quad (15)$$

Cuando se lleva a cabo la representación de la eficiencia catalítica ( $I_{cat}/I_{dif}$ ) respecto a la raíz cuadrada del tiempo de muestreo ( $t^{1/2}$ ) obteniéndose de este modo una serie de rectas en función de la concentración de analito. De la posterior representación de  $I_{cat}/I_{dif} / t^{1/2}$  frente a  $C^{1/2}$  se obtienen una recta, cuya pendiente permite estimar la constante catalítica de transferencia de carga ( $k$ ) a partir de la ecuación anterior.



# CAPÍTULO III

---

**ELECTROINJERTO DE SALES DE  
DIAZONIO SOBRE ELECTRODOS  
SERIGRAFIADOS DE CARBONO**



## **1. Electroinjerto de sales de diazonio sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono.**

Como ya se ha indicado en la introducción de esta memoria, la funcionalización de superficies de carbono mediante el procedimiento de reducción electroquímica de sales de diazonio, conocido popularmente como electroinjerto (ó electrografting) constituye un novedoso procedimiento de modificación de materiales y supone un importante avance, pues permite dotar de funcionalidad extrínseca a superficies electródicas a través de una metodología sencilla, de bajo coste y que proporciona modificaciones estables y robustas.

Esta metodología se ha utilizado generalmente como un primer paso en la modificación de superficies electródicas, siendo necesaria la derivatización *a posteriori* de la superficie electródica con materiales electroactivos si se quería dotar al electrodo de esta propiedad, ya que la película generada no poseía propiedades electroactivas. En el trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral, haciendo uso de esta metodología se han modificado diferentes superficies electródicas con compuestos electroactivos que presentan en su estructura grupos funcionales que permiten establecer un enlace covalente con el electrodo mediante electroinjerto, y a su vez pueden utilizarse como mediadores redox.

En una primera aproximación se seleccionaron una serie de compuestos que contienen una amina aromática primaria en su estructura, por tanto son susceptibles de sufrir reacción de diazotación, y cuyas propiedades como mediadores redox son ampliamente reconocidas. En particular se han estudiado cuatro compuestos colorantes, dos de ellos de la familia de las fenotiazinas, como son el Azure A y la Tionina; uno de la familia de la fenoxazina

como el Azul Nilo (o Nile Blue) y un último de la fenazina el Rojo Neutro (o Neutral Red).

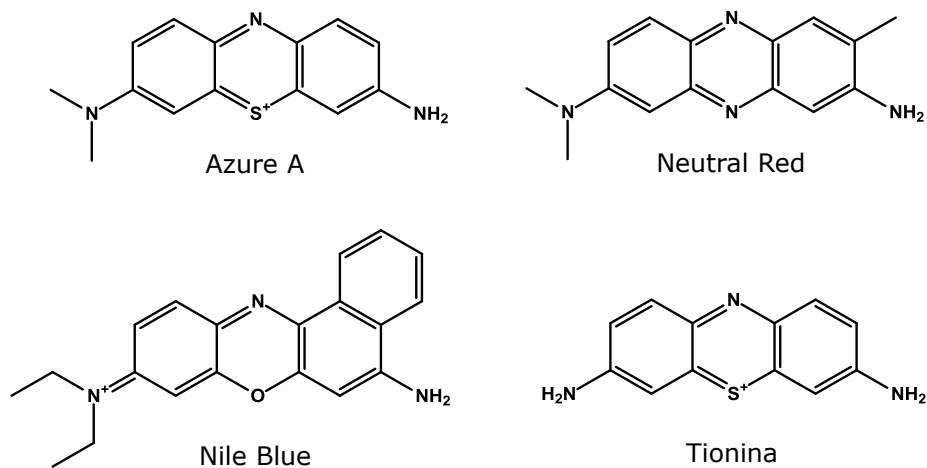


Fig. 20. Esquema de los compuestos utilizados en la modificación de superficies electródicas.

Tal como se ha descrito anteriormente, la reacción de diazotación se produce entre un compuesto que presente una amina aromática primaria en su estructura y nitrito sódico, agente causante de la formación de la sal de diazonio.

En primer lugar, se estudió la solubilidad en medio ácido de los compuestos mencionados. Para ello, se prepararon disoluciones de concentración 1 mM de las sales de diazonio descritas en HCl 0.1 M (pH 2); observándose que en estas condiciones a excepción del Azul Nilo, las demás presentaban una gran solubilidad.

### **1.1. Estudio espectrofotométrico de la reacción de diazotación.**

Con el objetivo de confirmar la formación de la sal de diazonio de los compuestos colorantes: Azure A, Rojo Neutro y Tionina en medio ácido, se realizaron estudios mediante espectrofotometría de absorción ultravioleta visible (UV-Vis). Se obtuvieron los espectros de las disoluciones de los colorantes en concentración 17  $\mu\text{M}$  y medio ácido (HCl 0.1M), tanto en ausencia (línea continua) como en presencia (línea discontinua) del agente causante de la diazotación de la amina aromática, el nitrito sódico. En los tres casos, los resultados obtenidos se muestran en la figura 21, donde se observa la presencia de una nueva banda, centrada entre 350 y 400 nm en el caso del Rojo Neutro y la Tionina, y a 450 nm en el caso del Azure A que se adscribe a la formación del grupo diazonio [133].

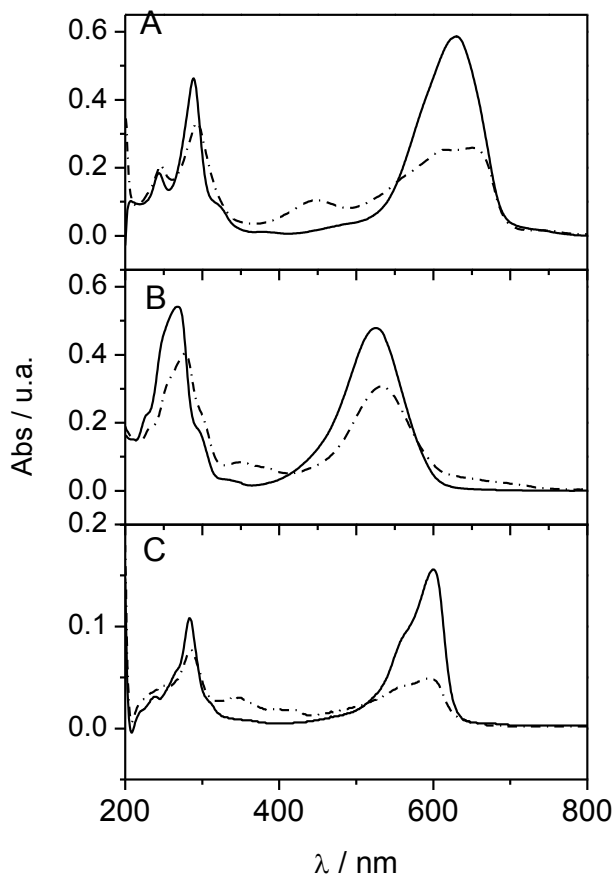


Fig. 21. Espectros UV-Vis del Azure A (fig.A), Rojo Neutro (fig.B) y Tionina (fig.C) en medio HCl (0.1M) sin diazotar (línea continua) y una vez formada la sal de diazonio (línea discontinua).

Asimismo, se observa un efecto hipocrómico de todas las bandas del espectro cuando el compuesto se encuentra diazotado. Este efecto se debe a una disminución del coeficiente de extinción molar y puede estar causado por una pérdida en la conjugación al llevar a cabo la diazotación de la molécula.



## **1.2. Estudios Ciclovoltamperométricos del electroinjerto de distintas sales de diazonio sobre electrodos serigrafiados de carbón.**

Tras llevar a cabo la reacción de diazotación de la molécula colorante para formar su correspondiente sal de diazonio, se procedió a estudiar el procedimiento de electroinjerto sobre la superficie electródica mediante voltamperometría cíclica, utilizando como transductores electroquímicos electrodos serigrafiados de carbono.

Previa a la modificación de la superficie de los electrodos serigrafiados de carbono, se realiza un tratamiento de activación, con el objetivo de obtener una superficie de trabajo libre de impurezas no deseadas, así como dotarla de una estructura reproducible y con un mayor número de posiciones activas [134]. La activación electroquímica se efectuó en medio ácido, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos. Una vez finalizado el tratamiento de activación de la superficie electródica, se lleva a cabo la etapa de electroinjerto aplicando cinco barridos cíclicos de potencial a una velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , entre los potenciales adecuados para cada sal de diazonio en concentración 1mM.

De acuerdo con lo descrito en la bibliografía, el potencial al que se produce la electroreducción del diazoderivado depende del material utilizado como superficie electródica, así como del medio de reacción [135].

En las figuras 22-24 se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto, para Azure A (figura 22), Rojo Neutro (figura 23) y Tionina (figura 24) en disoluciones 1mM del colorante en medio HCl 0.1 M. Como se puede observar en la figura 22.A, los voltamperogramas cíclicos correspondientes al electroinjerto del colorante Azure A sobre el

electrodo serigrafiado de carbono muestran en el barrido catódico dos procesos redox muy próximos. Un primer proceso centrado en +0.07 V (proceso (a)) se asigna a la reducción del grupo diazonio y el segundo proceso que aparece a un potencial y un segundo proceso que aparece a un potencial de +0.02 V (proceso (b)) en principio se asigna a la reducción del Azure A. Con objeto de confirmar esta asignación, en la figura 22.B se recoge la respuesta del electrodo modificado en ausencia del agente causante de la diazotación del Azure A. En este caso, en el barrido catódico se observa un solo proceso a un potencial de +0.03 V debido a la reducción de la fenotiazina, que se corresponde con el observado en la figura 22.A para el proceso (b). En el barrido anódico se observan igualmente dos procesos, el proceso (c) centrado en un potencial de +0.05 V que solamente se observa cuando se ha llevado a cabo la diazotación del Azure A y podría estar causado por la oxidación de formas azo y/o diazo generadas en el proceso de diazotación, y el proceso (d) que aparece a un potencial de +0.10 V, y por comparación con el pico anódico que se observa en la figura 22.B, se asigna a la oxidación de la fenotiazina.

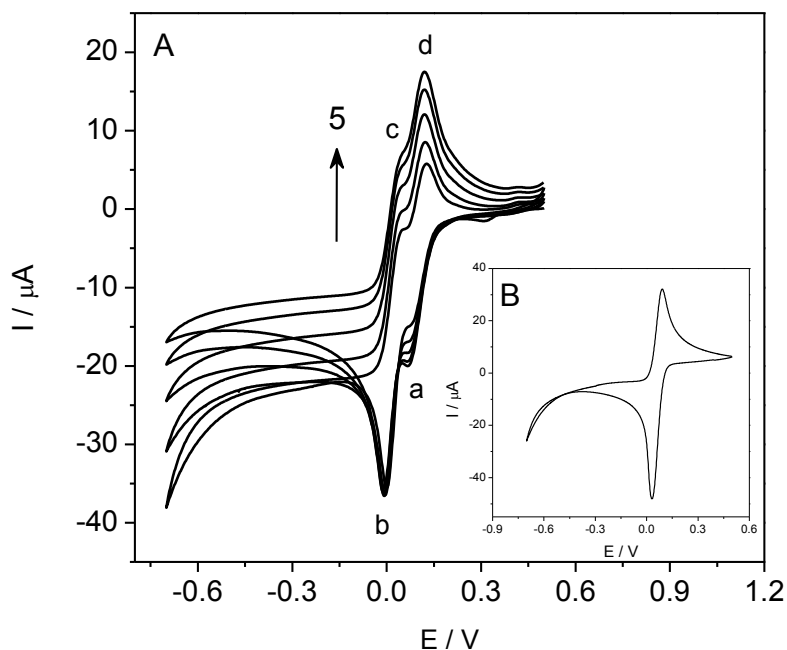


Fig. 22. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto (5 ciclos, 100mV/s) en el electrodo diazotado (A) y sin diazotar (B), se representa el 5º ciclo, con Azure A 1mM en medio HCl 0.1M.

En la figura 23, se representa el procedimiento de electroinjerto de la sal de diazonio del Rojo Neutro. En el barrido catódico, a -0.24 V, se observa un pico ancho que se puede corresponder con la reducción del grupo diazo y de la fenazina de manera conjunta. Por otra parte, en el barrido anódico se observa un pico ancho que se correspondería con la oxidación de la fenazina injertada sobre el electrodo.

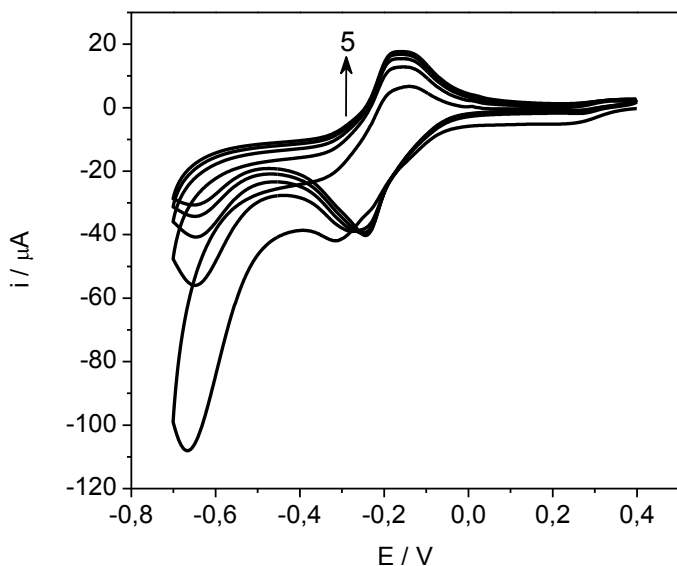


Fig. 23. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto (5 barridos, 100mV/s) de la sal de diazonio del Rojo Neutro 1mM en medio HCl 0.1M.

Por último, la Tionina (Fig. 24) presenta un voltamperograma cíclico complejo. La intensidad de corriente de todos los procesos redox aumentan en función del número de barridos de potencial, lo que es indicativo de un fenómeno de electropolimerización de la tionina sobre la superficie electródica incluso a potenciales tan bajos [136]. En el barrido catódico, el proceso (b) se observa a un potencial de +0.04 V, similar al obtenido para la reducción de la fenotiazina Azure A (Fig. 22), por lo que se puede asignar a la reducción de la tionina. Asimismo, en el barrido anódico, el pico (c) es un proceso débil que aparece a un potencial de +0.11 V, que si se compara con el observado en el Azure A en la figura 22.A podría asignarse a la oxidación de la Tionina.

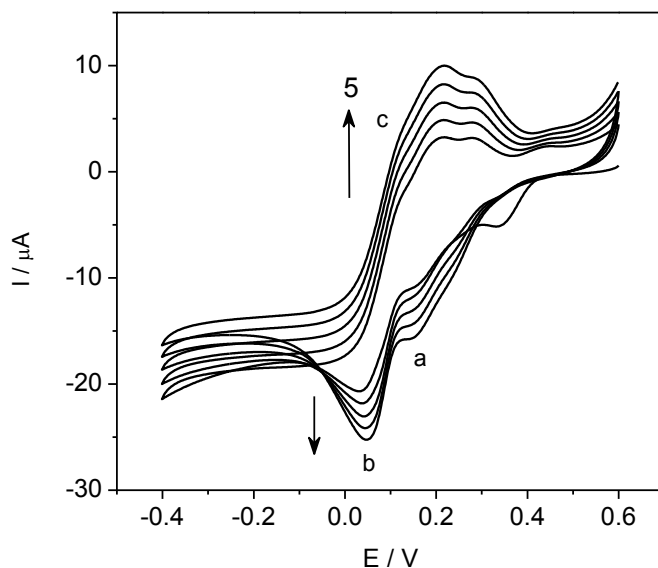


Fig. 24. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto (5 ciclos, 100mV/s) de la sal de diazonio de la Tionina (1mM) sobre electrodos serigrafiados de carbono en medio HCl 0.1M.

Dado que la Tionina electropolimeriza en las condiciones de trabajo y puesto que nuestro objetivo es modificar las superficies electródicas mediante electroinjerto a bajo potencial, optamos por descartar la Tionina de estudios posteriores.

En la siguiente tabla resumen se adjuntan el valor de los potenciales de pico anódico y catódico, el potencial formal del par redox, la diferencia de los potenciales de pico, así como la relación de intensidad de corriente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) y catódica ( $i_{pc}$ ) para los electrodos modificados mediante electroinjerto de Azure A y Rojo Neutro.

Tabla 2. Valores de la diferencia de potenciales de pico, potenciales formales y relación de intensidades de pico de los electrodos modificados con Azure A y Rojo Neutro.

	$\Delta E_p$ (V)	$E^{o'}$ (V)	$i_{pa} / i_{pc}$
<b>Azure A</b>	0.058	-0.286	0.919
<b>Rojo Neutro</b>	0.099	-0.277	1.378

Las similitudes existentes entre el potencial formal de ambos compuestos puede explicarse debido a la analogía estructural que presentan, puesto que únicamente difieren en un átomo del anillo central.

Por otra parte, la diferencia en los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) implica la existencia de limitaciones a la transferencia de carga respecto al comportamiento nernstiano ideal, donde  $E_{pa} = E_{pc}$ . Este impedimento cinético es mayor en el caso de electrodos modificados mediante electroinjerto de Rojo Neutro, donde la diferencia entre los potenciales de pico es aproximadamente el doble respecto a los electrodos modificados con películas electroactivas de Azure A.

Para un sistema químicamente reversible los valores de  $i_{pa}$  e  $i_{pc}$  son iguales, de modo que el cociente  $i_{pa} / i_{pc}$  es igual a la unidad, independientemente de la velocidad de barrido y de los coeficientes de difusión. Observamos que los electrodos modificados mediante la electroreducción de la sal de diazonio del Rojo Neutro presentan una mayor desviación en el cociente  $i_{pa} / i_{pc}$ , por tanto el sistema presenta una mayor irreversibilidad química.

Se evaluó la estabilidad de las películas injertadas. Dicha estabilidad se refirió en términos de pérdida de recubrimiento superficial de material electroactivo en función del número de ciclos de potencial. Con el objetivo de comparar ambos compuestos, se

representa el recubrimiento superficial relativo ( $\Gamma/\Gamma^0$ ), donde  $\Gamma^0$  representa el recubrimiento superficial, en  $\text{mol}/\text{cm}^2$ , del electrodo modificado tras el primer barrido cíclico; siendo  $\Gamma$  el valor obtenido para cada barrido posterior. Se aprecia que los electrodos modificados con ambos compuestos sufren una pérdida similar de recubrimiento en los primeros veinte ciclos de potencial, pérdida que se sitúa en aproximadamente un 10% del material de partida. Tras los primeros ciclos el material electroinjertado restante, aproximadamente el 80% del material inicial, se mantiene sobre la superficie del electrodo serigrafiado. La pérdida de recubrimiento tan significativa en los primeros barridos de potencial puede explicarse por el hecho de que se esté produciendo la desorción del material que no ha sido adecuadamente electroinjertado sobre la superficie.

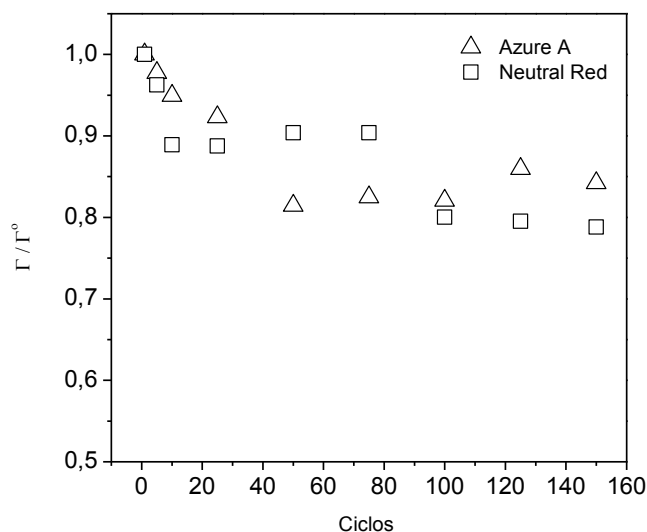


Fig. 25. Estudio de estabilidad de electrodos serigrafiados de carbono modificados mediante electroinjerto de Rojo Neutro (cuadrados) y Azure A (triángulos). Medidas experimentales realizadas en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a  $100\text{mVs}^{-1}$  tras la aplicación de 150 barridos.

Los resultados anteriores indican que aunque el proceso de electroinjerto se puede llevar a cabo de forma satisfactoria con los dos colorantes estudiados, las películas electroactivas de Rojo Neutro presentan mayores limitaciones cinéticas a la transferencia de carga que las correspondientes de Azure A. Dada la existencia en la bibliográfica de mayor número de estudios realizados utilizando Rojo Neutro, se optó por continuar el desarrollo y posterior caracterización electroquímica, así como el estudio de aplicaciones futuras sobre superficies electródicas de carbón con el derivado de la fenotiazina, Azure A.

## **2. Electroinjerto de la sal de diazonio del Azure A sobre la superficie de electrodos serigrafiados de carbono.**

El electroinjerto de la molécula de Azure A sobre superficies electródicas puede aportar ventajas significativas respecto a otras moléculas, como se ha descrito en el capítulo introductorio, ya que permite deslocalizar la carga electrónica por la estructura aromática de la molécula, lo que la dota de propiedades redox. Por otra parte, la especificidad de la reacción de diazotación hacia las aminas aromáticas primarias permite, gracias a la presencia de un único grupo de este tipo en la molécula de Azure A, orientar las moléculas electroinjertadas en una dirección determinada, donde la amina terciaria se dispondrá hacia el seno de la disolución. Esto conlleva una estructuración de la superficie electródica, por lo que se consigue una mayor homogeneidad en la modificación superficial, que implicará una mejora en la reproducibilidad de la respuesta.

Por ello en el trabajo desarrollado se abordó el estudio del electroinjerto de Azure A sobre electrodos serigrafiados de carbono, mediante electroreducción de la correspondiente sal de diazonio. En primer lugar, se estudió el efecto de la formación de un enlace



covalente entre el Azure A y la superficie electródica, en contraposición a la adsorción inespecífica de este. Para ello, dos electrodos serigrafiados de carbono previamente activados, se sumergieron en una disolución 10 mM de Azure A en presencia (Fig.26.A) y en ausencia (Fig.26.B) de nitrito sódico, el agente causante de la reacción de diazotación. A continuación, se aplicaron cinco barridos cíclicos de potencial entre +0.5 y -0.7 V a ambos electrodos a una velocidad de 100 mVs<sup>-1</sup>; siendo el electrodo donde se ha generado el grupo diazonio el único donde se ha podido llevar a cabo la electroreducción del mismo y por ende el electroinjerto. La modificación mediante electroinjerto (Fig. 26.A) da lugar a tres procesos en el barrido catódico. El primero de ellos centrado en +0.33 V es un proceso que desaparece tras el primer barrido y podría asignarse a la reducción del anillo de fenazina; el pico que presenta una mayor intensidad, centrado en +0.00 V, se debe a la reducción del grupo diazonio y por último el pico que aparece a -0.10 V es debido a la reducción de la fenotiazina. En el barrido anódico se observa un pico a +0.21 V, que se asigna a la oxidación de la fenotiazina. En contraposición, cuando se aplican ciclos de potencial al electrodo sumergido en la disolución de Azure A sin diazotar, únicamente se observa un proceso redox a -0.10 V en el barrido catódico y a +0.10 V en el anódico que se adscribe a la reducción y oxidación de la fenotiazina.

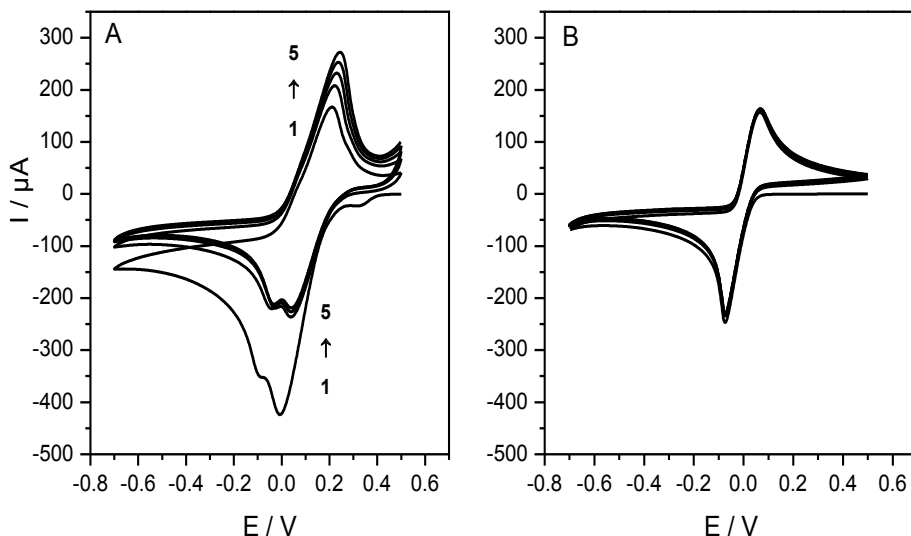


Fig. 26. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto (5 ciclos, 100mV/s) en el electrodo diazotado (A) y sin diazotar (B) con Azure A 10mM en medio HCl 0.1M.

Posteriormente, se estudió la respuesta electroquímica de sendos electrodos modificados, para ello una vez aclarados cuidadosamente con agua destilada se sumergen en tampón fosfato pH7 (0.1M) en ausencia de Azure A y, mediante voltamperometría cíclica, se aplica un barrido de potencial entre +0.6 y -0.4 V a una velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Como se observa en la figura 27, cuando se ha llevado a cabo el electroinjerto de Azure A sobre la superficie del electrodo (línea continua) se obtiene una respuesta electroquímica significativamente mejor que la obtenida en ausencia de diazotación de la fenotiazina (línea discontinua). El electrodo modificado mediante electroinjerto, muestra un par redox con un potencial formal de -0.27 V, asociado a la oxidación y reducción de la fenotiazina covalentemente enlazada a la superficie electródica. Además de este proceso principal observamos otro menos definido a

-0.5 V, que tiene lugar al mismo potencial formal que el par redox correspondiente al electrodo modificado en ausencia de diazotación. Dicha ausencia de diazotación implica que la única posibilidad de interacción entre la molécula de Azure A y el electrodo sea mediante la adsorción a través del sistema aromático presente en la fenotiazina.

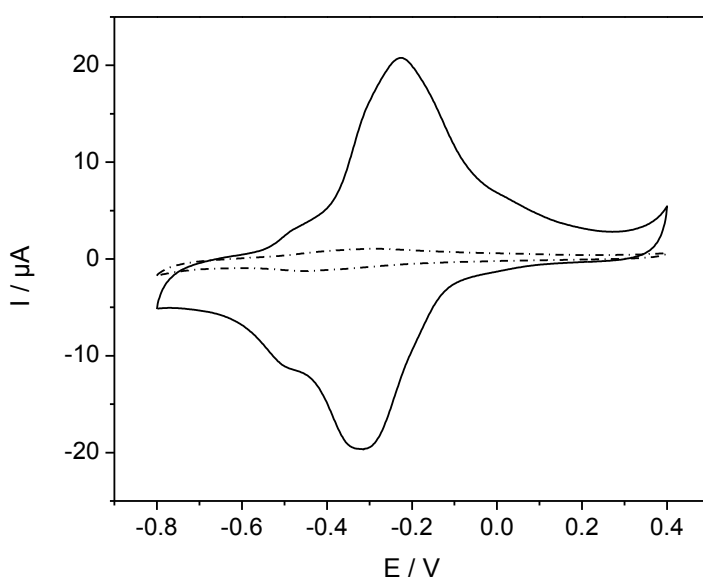


Fig. 27. Voltamperogramas cíclicos (ciclo número 20) de los electrodos de carbono modificados con Azure A (10mM) diazotado (línea continua) y sin diazotar (línea discontinua) obtenidos en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a 100mV/s.

Como se puede observar en la tabla 3, el cociente entre las intensidades de pico anódico y catódico, muestra un comportamiento químicamente más reversible cuando el Azure A se electroinjerta en la superficie del electrodo serigrafiado de carbono que cuando se adsorbe inespecíficamente. Del mismo modo, la diferencia entre los potenciales de pico indica la existencia de limitaciones en la

transferencia de carga que son mayores cuando el procedimiento de modificación de la superficie se produce mediante adsorción.

Tabla 3. Valores de la relación de intensidades de pico, potenciales anódico y catódico, diferencia de potenciales de pico y potenciales formales de los electrodos modificados mediante electroinjerto o adsorción de Azure A.

	$i_{pa} / i_{pc}$	$E_a$ (V)	$E_c$ (V)	$\Delta E_p$ (V)	$E^{o'}$ (V)
<b>Electroinjerto</b>	1.06	-0.22	-0.32	0.10	-0.27
<b>Adsorción</b>	0.85	-0.28	-0.45	0.17	-0.50

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de los electrodos modificados obtenidos se llevó a cabo el cálculo del recubrimiento superficial anódico ( $\Gamma_a$ ), tal y como se describe en el procedimiento experimental. Para ello los electrodos se sumergieron en disolución tampón pH 7 previamente desoxigenada en ausencia de Azure A y se aplicaron ciclos continuos de potencial entre -0.6 y +0.4 V a una velocidad de 100 mVs<sup>-1</sup>.

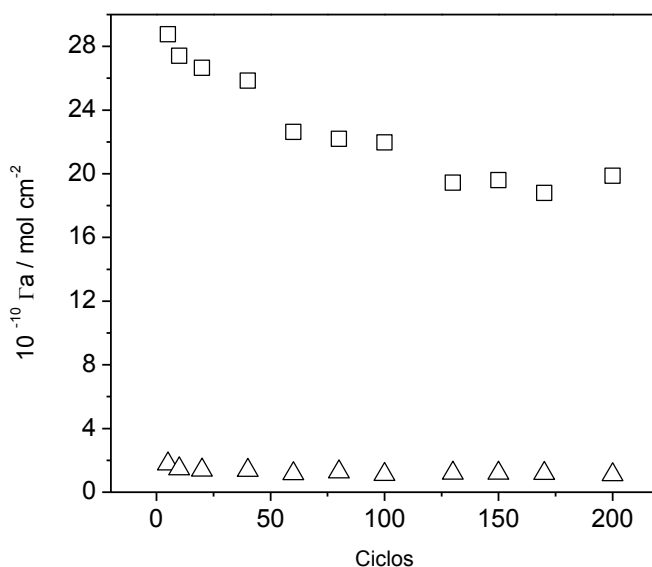


Fig. 28. Estudio de estabilidad de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con Azure A 10 mM diazotado (cuadrados) y sin diazotar (triángulos) en la etapa de electroinjerto.

Cabe destacar que, como se observa en la figura 28, los electrodos modificados con Azure A por adsorción muestran un recubrimiento superficial significativamente inferior a los modificados mediante electroinjerto. Este modesto valor de recubrimiento podría explicarse debido a la conjunción de dos efectos: a la mayor área molecular proyectada de la molécula de Azure A cuando se dispone de manera planar a la superficie electródica y a las pérdidas de material electroactivo producidas al aplicar ciclos de potencial, causadas por la mayor labilidad de la unión molécula-transductor.

El electrodo modificado mediante electroinjerto, muestra una pérdida de aproximadamente un 30% del material de partida tras la aplicación de 200 ciclos de potencial. Como se observa en la figura 28, durante los primeros veinte ciclos se produce una pérdida acusada de recubrimiento superficial, situada en un 30% de la

pérdida total. Esta caída se supone debida a pérdidas de material que no se ha electroinjertado correctamente, por tanto se encuentra débilmente adsorbido sobre el electrodo y se desorbe con facilidad. Con objeto de eliminar el material adsorbido sobre la superficie electródica que no se haya podido eliminar mediante el aclarado con agua destilada, y pueda ser causante de variabilidad en la respuesta electroquímica, en adelante se efectuó un acondicionamiento posterior a la etapa de electroinjerto, consistente en aplicar veinte barridos cíclicos de potencial en tampón fosfato pH 7 (0.1M) antes de utilizar el electrodo modificado.

### **3. Optimización del procedimiento de electroinjerto.**

#### **3.1. Influencia del número de ciclos de potencial y de la concentración de Azure A en la etapa de electroinjerto.**

El procedimiento de electroinjerto, como se ha comentado anteriormente es un proceso en dos etapas: en la primera se genera la sal de diazonio que posteriormente se reduce electroquímicamente, generando un radical que se enlaza mediante un enlace covalente al sustrato. Dada la alta reactividad del radical arilo generado por electroreducción de la sal de diazonio, este puede reaccionar bien sobre posiciones de la superficie electródica estéricamente impedidas, bien sobre las posiciones activas de las moléculas ya electroinjertadas sobre la superficie electródica (Fig. 29), dando lugar a multicapas de material que pueden extenderse hasta las decenas de nanómetros y alterar las propiedades de la película electroactiva [65]. La principal dificultad de este procedimiento de modificación superficial estriba en el exhaustivo control de las condiciones en las que se tiene que llevar a cabo la etapa de electroinjerto para evitar o minimizar, en la medida de lo

posible, la formación de multicapas o de monocapas compactas de material que dificulten la transferencia electrónica a través de la película. El recubrimiento superficial,  $\Gamma_a$ , calculado según se describe en el procedimiento experimental; será el parámetro que permitirá evaluar la formación de multicapas de material sobre la superficie electrodo.

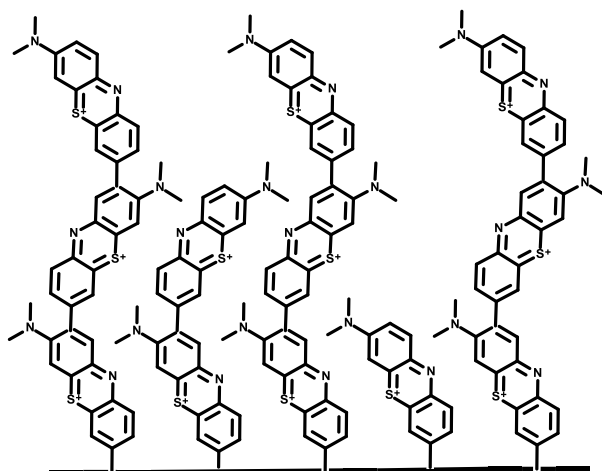


Fig. 29. Esquema de la formación de multicapas de Azure A sobre la superficie electrodo.

La cantidad de material electroactivo injertado sobre la superficie electrodo va a depender, fundamentalmente, de las condiciones en las que se produzca la electroreducción de la sal de diazonio. Por todo ello, la optimización de los distintos parámetros de la etapa de electroinjerto, tales como número de ciclos de potencial y concentración de la sal de diazonio, serán cruciales para ejercer un control preciso sobre las propiedades de la película de Azure A generada.

Pinson y Podvorica estimaron el recubrimiento asociado a una monocapa compacta, mediante cálculos teóricos para una molécula de benceno con sustitución en *para* y sin posibilidad de rotación en  $13.5 \cdot 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup> [66]. No obstante, el recubrimiento superficial real se ve marcadamente influenciado por la rugosidad y el número de posiciones activas del electrodo. Dado que la rugosidad de los electrodos serigrafados de carbono es significativamente elevada, como establecen Fanjul y Costa en su artículo [137], estimamos que el valor esperado para el recubrimiento superficial de películas electroactivas de Azure A sobre estos electrodos correspondiente a una monocapa debería ser ligeramente superior al teórico.

El efecto del número de barridos cíclicos de electroinjerto (Fig.30) y de la concentración de sal de diazonio en disolución (Fig.31) se evaluó mediante la aplicación en la etapa de electroinjerto de un número distinto de ciclos de potencial, así como la utilización de concentraciones diferentes en la modificación de una serie de electrodos serigrafados de carbono. Posteriormente mediante voltametría cíclica entre +0.4 y -0.8 V a 100 mVs<sup>-1</sup> en tampón fosfato pH 7 (0.1M) y ausencia de Azure A se realizó el estudio de estabilidad de los correspondientes electrodos modificados obtenidos.

En la figura 30, se aprecia como los electrodos modificados mediante cinco ciclos de electroinjerto (Fig.A) presentan una mayor estabilidad que aquellos modificados mediante un ciclo de electroinjerto (Fig.B), cuya pérdida de material electroactivo tras 200 ciclos de potencial alcanza el 60% del material de partida. El resultado obtenido tras la aplicación de un número insuficiente de barridos en la etapa de electroinjerto parece indicar que el recubrimiento superficial no es homogéneo. De modo que, coexisten zonas donde el Azure A se encuentra electroinjertado con zonas donde se encuentra adsorbido, siendo estas moléculas las causantes de la pérdida de material.



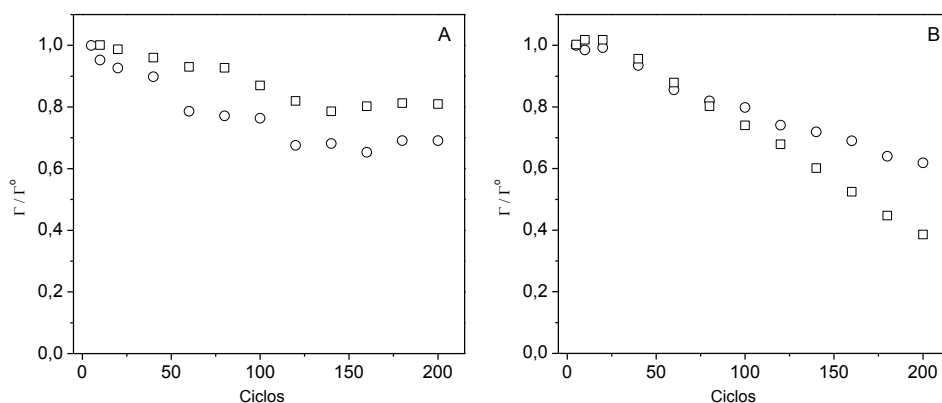


Fig. 30. Recubrimiento superficial relativo anódico (círculos) y catódico (cuadrados) de electrodos modificados con 5 ciclos de electroinjerto de Azure A (Fig.A) y 1 ciclo de electroinjerto (Fig.B).

Por otra parte, se evaluó el efecto de la concentración de la sal de diazonio para un mismo número de ciclos (Fig. 31). Una vez obtenidos los valores correspondientes al recubrimiento para 1, 5 y 10 mM de sal de diazonio de Azure A se observa que dichos recubrimientos cuando se modifica con 1 y 5 mM se encuentran por debajo del recubrimiento de  $13.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$  que según los cálculos teóricos, se considera correspondiente a una monocapa. Por tanto, con el fin de asegurar que el recubrimiento superficial sea completo se optó por llevar a cabo el electroinjerto con una concentración de sal de diazonio de 10 mM.

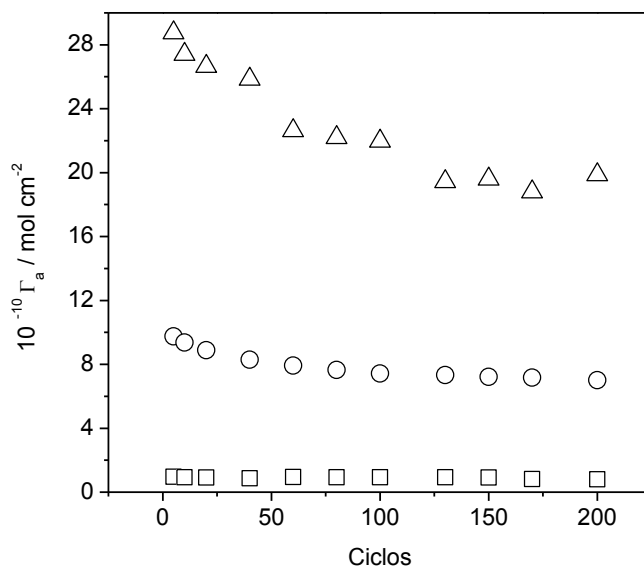


Fig. 31. Estabilidad de electrodos modificados mediante 5 ciclos de electroinjerto de Azure A y distintas concentraciones de la sal de diazonio: 1 mM (cuadrados), 5 mM (círculos) y 10 mM (triángulos).

En base a los resultados obtenidos en los estudios anteriores, consideramos que las condiciones de electroinjerto que mejor se ajustan al recubrimiento que se estima asociado a una monocapa se obtiene para una concentración de 10 mM de la sal de diazonio de Azure A y diez ciclos de potencial en la etapa de electroinjerto.

### 3.2. Efecto de la velocidad de barrido en la etapa de electroinjerto.

Asimismo, se ha estudiado el efecto de la velocidad de barrido de potencial en la formación de la película electroactiva. La figura 32.A, muestra los voltamperogramas obtenidos a velocidades de barrido desde  $10 \text{ mVs}^{-1}$  hasta  $200 \text{ mVs}^{-1}$ . La relación lineal existente

entre la intensidad de pico y la velocidad de barrido (Fig.32.B), indica que nos encontramos ante un proceso controlado por la difusión de la sal de diazonio hacia la superficie electródica donde posteriormente se produce su electroreducción y la consecuente formación del enlace covalente entre la molécula de Azure A y la superficie electródica.

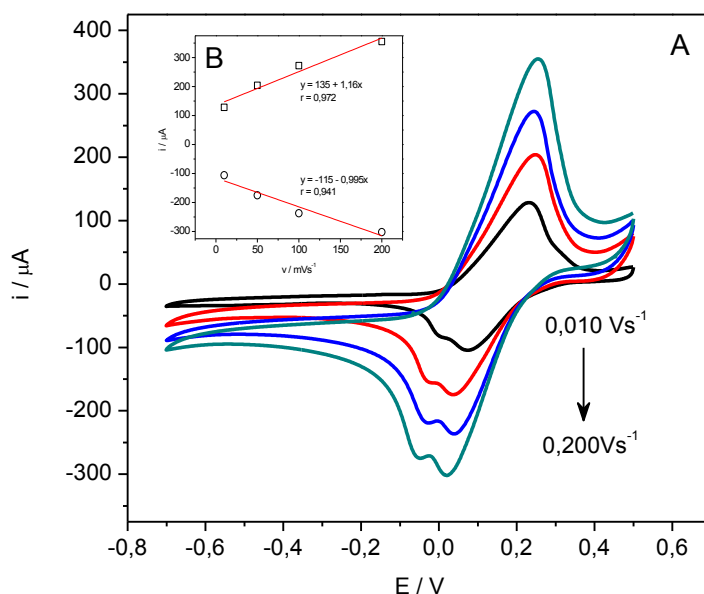


Fig. 32. A) Voltamperogramas cíclicos de los electrodos de carbono modificados con Azure A (10mM, 5 ciclos de potencial) obtenidos a diferentes velocidades de barrido en medio HCl 0.1M. Inserto B) Representación intensidad de pico anódica (cuadrados) y catódica (círculos) en función de la velocidad de barrido obtenidos de los voltamperogramas representados.

Analizar la influencia de la velocidad de barrido en el recubrimiento de la película electroactiva obtenida presenta una mayor complejidad, dado que fijar el número de ciclos de potencial implica que el tiempo total en el que se aplican dichos ciclos se incrementa gradualmente. Así, la duración del procedimiento de electroinjerto cuando se utiliza una velocidad de 10  $\text{mVs}^{-1}$  es 200

veces superior a la correspondiente a  $200 \text{ mVs}^{-1}$ ; efecto que, como se observa en la gráfica de la figura 33, afecta al recubrimiento final obtenido.

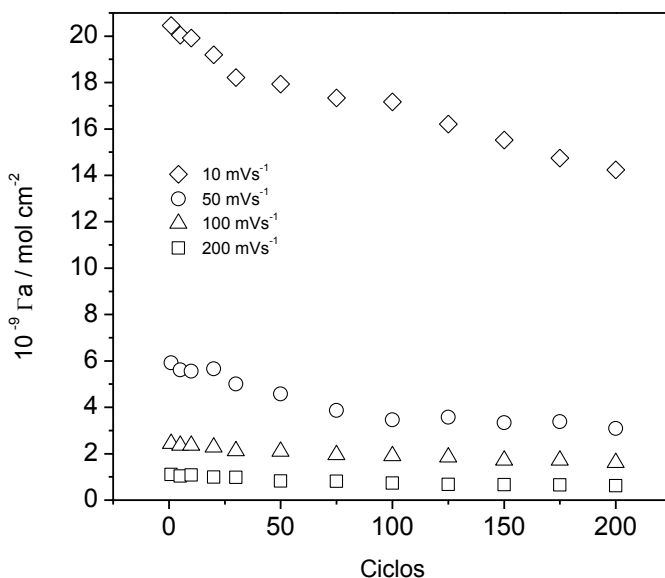


Fig. 33. Estabilidad de electrodos modificados en tampón fosfato pH 7 (0.1M) tras realizar el electroinjerto de Azure A (10mM, 5 ciclos) a diferentes velocidades de barrido:  $10 \text{ mVs}^{-1}$  (rombos),  $50 \text{ mVs}^{-1}$  (círculos),  $100 \text{ mVs}^{-1}$  (triángulos) y  $200 \text{ mVs}^{-1}$  (cuadrados).

El alto valor de recubrimiento obtenido a las velocidades de barrido más bajas ( $10$  y  $50 \text{ mVs}^{-1}$ ), puede ser debido a que bajo estas condiciones puede favorecerse la formación de una primera capa de moléculas de Azure A muy compacta, sin posibilidad de rotación o el electroinjerto de nuevas moléculas de fenotiazina dando lugar a la formación de multicapas de Azure A. Sin embargo, estas películas muestran una menor estabilidad. Por todo ello, con el fin de minimizar la formación de multicapas y obtener películas estables, se eligió una velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$  como valor óptimo para estudios

posteriores. Además, el tiempo para llevar a cabo el procedimiento de electroinjerto a esta velocidad de barrido se considera aceptable.

### **3.3. Efecto del pH en el electrodo modificado.**

El Azure A posee en su estructura grupos ácido-base por lo que su comportamiento estará influenciado por el pH del medio de trabajo [7]. Por tanto, será necesario evaluar la respuesta de los electrodos modificados con películas de Azure A en función del pH de la disolución.

Tras realizar el procedimiento de electroinjerto mediante las condiciones previamente optimizadas, los electrodos modificados se aclararon con agua destilada, y se sumergieron en las disoluciones tampón del pH entre 5 y 8. A continuación se aplicaron ciclos de potencial desde -0.7 V a +0.5 V a  $100 \text{ mVs}^{-1}$  durante diez minutos, y se registró su imagen ciclovoltamperométrica. En la figura 34, se puede observar que los electrodos modificados muestran una clara dependencia del potencial de pico, tanto anódico como catódico, así como de la intensidad de corriente de pico, con el pH en el intervalo de estudio.

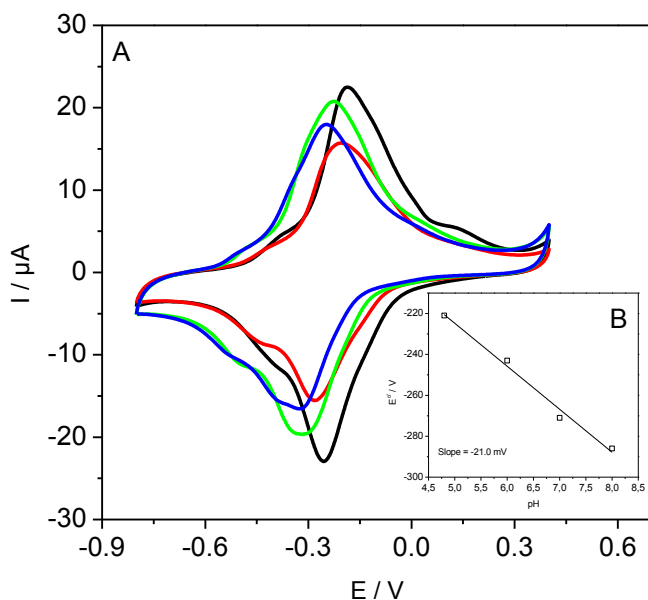


Fig. 34.A) Voltamperogramas cíclicos (ciclo número 20) de los electrodos modificados con Azure A obtenidos a 100 mV/s en tampón acético/acetato 0.1M pH 5.0 (negro), y fosfato 0.1M a pH 6 (rojo), pH 7 (verde) y pH 8 (azul). Inserto B) Variación del potencial formal respecto al pH obtenido a partir de los voltamperogramas anteriores.

El desplazamiento en el potencial de pico hacia valores más negativos al aumentar el pH es indicativo de la presencia de protones implicados en la reacción electroquímica. Por otra parte, existe una relación lineal entre el potencial formal asociado al par redox y el pH (Fig. 34.B), el valor de la pendiente se corresponde con un proceso donde se intercambian dos electrones y un protón. En el caso particular del Azure A inmovilizado sobre electrodos serigrafados de carbono el mecanismo viene ilustrado en la figura 35.

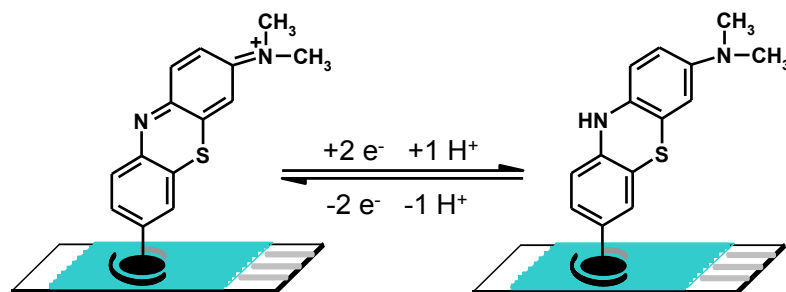


Fig. 35. Mecanismo de oxidación-reducción del Azure A sobre electrodos CSPE.

### 3.4. Cinética de transferencia electrónica a través de películas electroinjetadas de Azure A.

Con el objetivo de estudiar las limitaciones cinéticas que se apuntaron anteriormente, se lleva a cabo el estudio del comportamiento de las películas electroactivas de Azure A en función de la velocidad de barrido. Para lo cual se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado, a velocidades de barrido crecientes.

La respuesta de los electrodos modificados mediante electroinjerto presenta el comportamiento característico de un par redox confinado en la superficie electródica, dado que tanto la corriente de pico anódica como catódica son proporcionales a la velocidad de barrido para velocidades inferiores a  $400 \text{ mVs}^{-1}$  (Fig. 36). Además, a bajas velocidades de barrido el potencial formal ( $E^{\circ}$ ) del sistema permanece prácticamente constante lo que sugiere una cinética de transferencia de carga rápida; mientras que la diferencia entre los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) indica un comportamiento electroquímico cuasi-reversible.

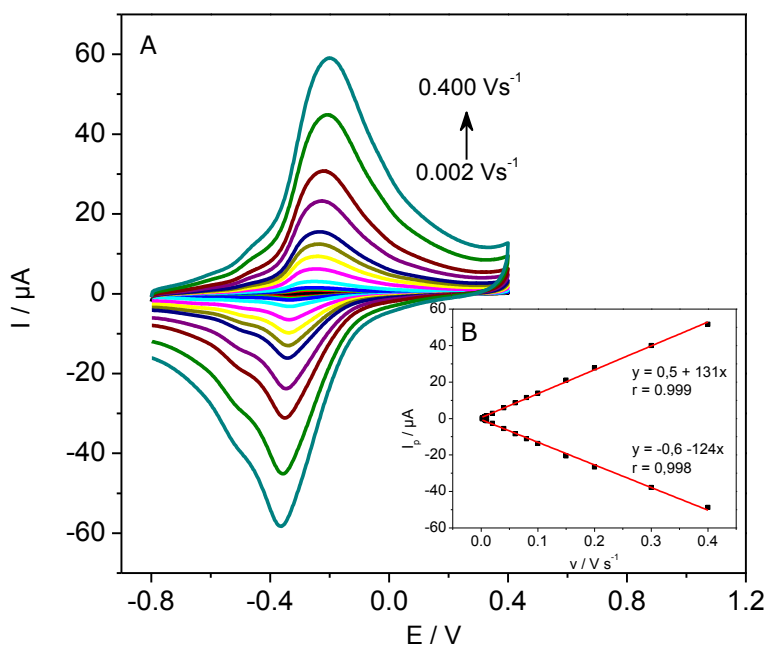


Fig. 36. A) Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con Azure A (10 mM, 5sc) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a bajas velocidades de barrido. Inserto B) Representación de la intensidad de corriente de pico anódica y catódica en función de la velocidad de barrido, en tampón fosfato pH 7 (0.1M).

A velocidades de barrido superiores a  $1.0 \text{ Vs}^{-1}$  los valores de  $\Delta E_p$  superan el valor de  $200/n \text{ mV}$ , donde  $n$  es el número de electrones implicados en el proceso redox, en este caso  $n=2$ . Este hecho, según el trabajo publicado por Laviron, resulta indicativo de la existencia de serias limitaciones cinéticas en la transferencia de carga a través de la película de Azure A. Por otra parte, en la gráfica 36.B se muestra la variación de la intensidad de corriente de pico tanto anódica como catódica en función de la velocidad de barrido. Se puede observar que ambas muestran una dependencia lineal con la velocidad de barrido, por tanto la película electroinjetada de Azure A muestra el comportamiento característico de materiales redox inmovilizados sobre la superficie del electrodo.



Dado que el mediador redox se encuentra inmovilizado sobre la superficie del electrodo, se ha utilizado el método descrito por Laviron para determinar el coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ) y la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ). Para ello se ha medido la variación de los potenciales de pico a distintas velocidades de barrido. En la figura 37 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos, así como la variación del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad de barrido (Fig 37.B).

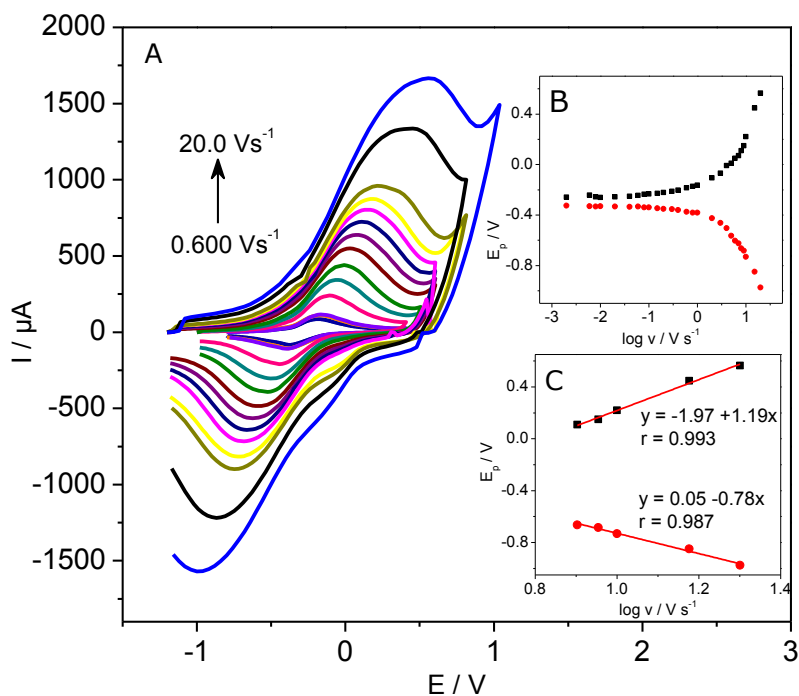


Fig. 37. A) Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con Azure A (10 mM, 5 ciclos) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a altas velocidades de barrido. Inserto B) Representación del potencial de pico anódico (cuadrados negros) y catódico (triángulos rojos) en función del logaritmo de la velocidad de barrido. Inserto C) Ajuste lineal de la diferencia de potenciales de pico en función del logaritmo de la velocidad para velocidades superiores a 8.0  $\text{Vs}^{-1}$ .

A velocidades superiores a  $8.0 \text{ Vs}^{-1}$  podemos observar que los valores de los potenciales de pico presentan un comportamiento lineal con el logaritmo de la velocidad de barrido, tal como queda representado en la figura 37.C; como se describe en el capítulo de materiales y métodos, de la intersección de la pendiente de dichas rectas con la línea que representa el potencial formal se obtiene un valor de 0.6 para el coeficiente de transferencia de carga ( $\alpha$ ). De acuerdo a la ecuación (4) descrita en el capítulo experimental se puede calcular la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ), obteniéndose un valor de  $124 \text{ s}^{-1}$ . Si se compara el valor de  $k_s$  obtenido con otros reportados en la bibliografía, por ejemplo para la fenotiazina Azul de Toluidina, un análogo estructural, tanto si se encuentra adsorbida ( $k_s = 11.6 \text{ s}^{-1}$ ) como electroinjertada sobre la superficie de un electrodo serigrafado de carbono ( $k_s = 1.21 \text{ s}^{-1}$ ) [80], los valores de  $k_s$  reportados para esta fenotiazina son inferiores al descrito en el presente trabajo. Además, cabe destacar que el valor de  $k_s$  obtenido para los electrodos modificados mediante electroinjerto de Azure A presenta un valor dos órdenes de magnitud mayor que el obtenido cuando se produce el electroinjerto del Azul de Toluidina.

#### **4. Estudio de la Electrooxidación de NADH sobre electrodos modificados con Azure A.**

Como se ha descrito en el capítulo introductorio, la oxidación electroquímica del cofactor NADH es de un gran interés en el desarrollo de biosensores enzimáticos, puesto que está presente en más de 200 enzimas deshidrogenasas. No obstante, la oxidación de NADH sobre superficies electródicas es un proceso irreversible que plantea una serie de inconvenientes. El principal problema reside en que la oxidación se produce a altos sobrepotenciales. Además, las

especies provenientes de reacciones de dimerización y desprotonación generadas en el proceso de oxidación se adsorben rápidamente sobre la superficie, envenenando el electrodo [72], [73]. La utilización de mediadores redox tiene como finalidad reducir la sobretensión de oxidación; así como evitar la adsorción de sustancias que inhiban la respuesta electroquímica del electrodo. En este sentido, en la última década, las fenotiazinas y compuestos análogos se han postulado como moléculas muy prometedoras por su capacidad electrocatalítica.

Por tanto, se estudió la respuesta de los electrodos modificados mediante electroinjerto de Azure A frente a la electrooxidación de NADH. Con el fin de corroborar las ventajas de la modificación mediante electroinjerto, los resultados se compararon con los obtenidos con electrodos modificados con Azure A por adsorción directa. Asimismo, se obtuvieron las respuestas de los electrodos sin modificar, utilizándose como referencia. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos a  $10 \text{ mVs}^{-1}$  en ausencia y en presencia de NADH se muestran en la figura 38, para un electrodo serigrafiado de carbono sin modificar (38.A), un electrodo modificado mediante adsorción (38.B) y un electrodo modificado mediante electroinjerto de Azure A (38.C).

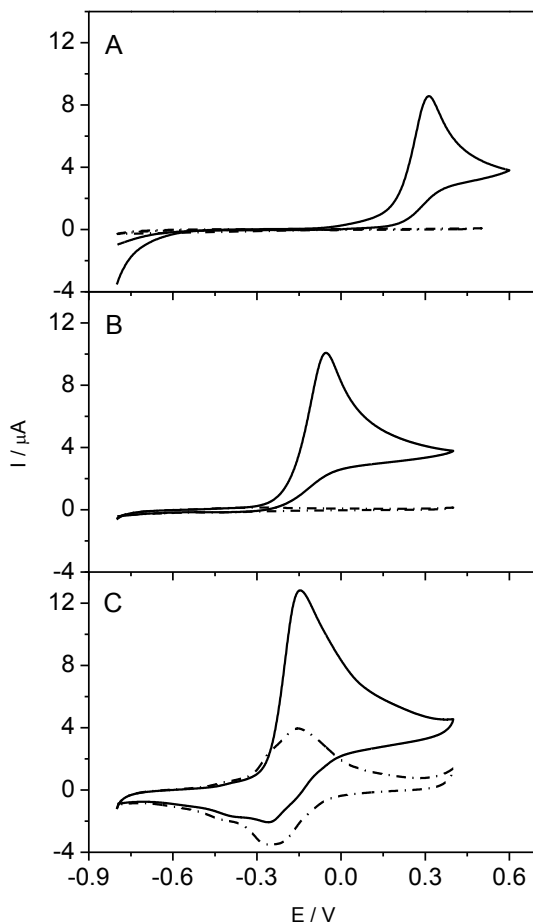


Fig. 38. Voltamperogramas cíclicos del electrodo sin modificar (A) o bien modificado con Azure A (10 mM, 5 ciclos) en ausencia de diazotación (B) o diazotado (C) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a  $10 \text{ mVs}^{-1}$  en ausencia (línea discontinua) o presencia (línea continua) de NADH 1mM.

En la figura 38.A se aprecia que la oxidación de NADH sobre electrodos serigrafados de carbono sin modificar aparece a un potencial de oxidación de +0.31 V. Por el contrario, cuando la superficie del electrodo se modifica con la molécula de Azure A, se observa una reducción significativa en la sobretensión a la que aparece la oxidación del NADH tanto en los electrodos modificados

mediante adsorción como mediante electroinjerto (Fig. 38.B y 38.C), en este último caso la reducción de la sobretensión alcanza los 450 mV. El electroinjerto de Azure A supone una disminución adicional de 150 mV respecto a la adsorción (Fig.38.B) y un aumento en la intensidad de corriente catalítica. Los voltamperogramas cíclicos, muestran un aumento significativo de la corriente de pico anódica concomitante a una disminución en la corriente catódica; este comportamiento es característico de un proceso electrocatalítico. Estos resultados ponen de manifiesto la mejora que supone la modificación de la superficie electródica con Azure A independientemente del método utilizado en la modificación de la superficie electródica. Adicionalmente, el electroinjerto del mediador supone ventajas adicionales frente a la adsorción directa, como son una mayor corriente electrocatalítica y una mayor estabilidad.

#### **4.1. Influencia de la cantidad de Azure A electroinjertado sobre la oxidación catalítica de NADH.**

La cantidad de Azure A electroinjertado es un factor de variabilidad en las propiedades de la película electroactiva resultantes. En consecuencia, estudiar su influencia frente a la oxidación catalítica de NADH conlleva una importancia crucial para optimizar las propiedades del sensor.

En la figura 39 se muestra los voltamperogramas cíclicos de los electrodos serigrafiados de carbono modificados con 1, 5 y 10 mM de sal de diazonio de Azure A en la etapa de electroinjerto que tras llevar a cabo su acondicionamiento, se sumergieron en una disolución de tampón fosfato pH 7 (0.1 M) que contiene 1.0 mM de NADH. Como se puede observar en la figura 39, el efecto electrocatalítico causado por la oxidación del NADH se aprecia en todo el intervalo de

concentración ensayado. La disminución del sobrepotencial, se aproxima en todos los casos sometidos a estudio a los 400 mV.

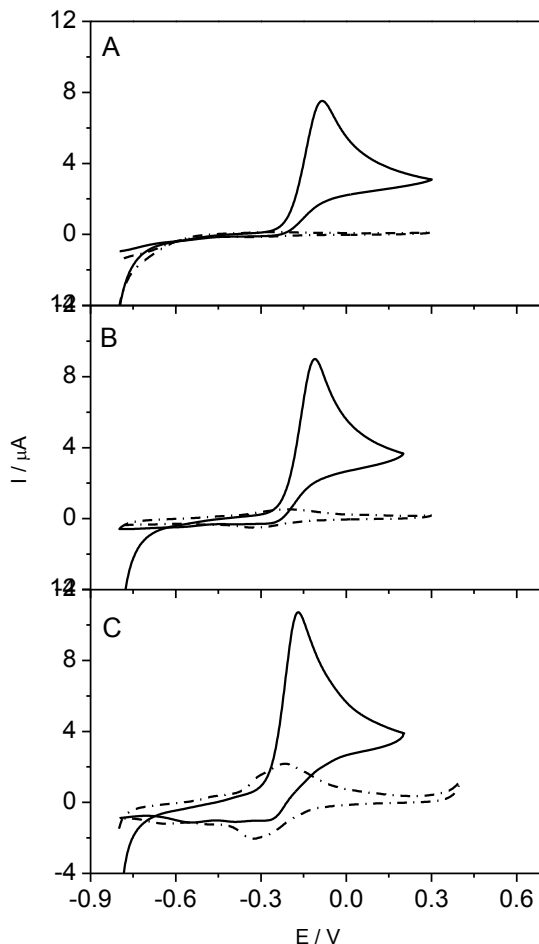


Fig. 39. Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con Azure A (A, B, C) en tampón fosfato pH 7 (0.1 M) a  $10 \text{ mVs}^{-1}$  en ausencia (línea continua) o presencia (línea discontinua) de NADH 1 mM. Las gráficas A, B y C representan concentración de sal de diazonio en la etapa de electroinjerto de 1, 5 y 10 mM, respectivamente.

La eficiencia catalítica del sensor, definida como la relación entre la corriente catalítica ( $I_{\text{cat}}$ ) y la corriente obtenida para el mediador redox en ausencia de NADH ( $I_{\text{dif}}$ ), se utiliza para evaluar el

efecto que la concentración de Azure A en la etapa de electroinjerto causa sobre la intensidad de corriente catalítica. Los resultados recogidos en la figura 40 muestran que la eficiencia catalítica ( $I_{cat}/I_{dif}$ ) disminuye al aumentar la cantidad de Azure A electroinjertada. La eficiencia para electrodos modificados con 1 mM de Azure A presenta un valor casi cuatro veces superior respecto a la siguiente concentración ensayada (5 mM) y diez veces respecto a los electrodos modificados con 10 mM.

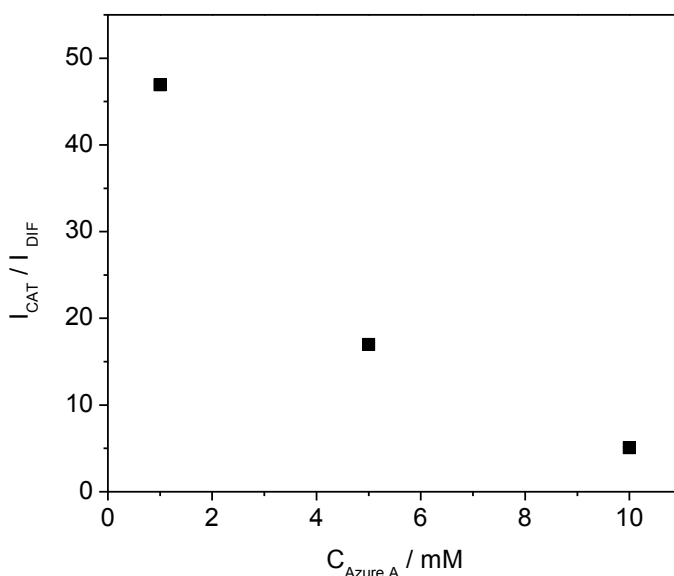


Fig. 40. Eficiencia catalítica del sensor de NADH en función de la concentración de la sal de diazonio de Azure A utilizada en la etapa de electroinjerto.

Pese a que utilizar una concentración de 1 mM de Azure A en la etapa de electroinjerto aporta la mayor eficiencia catalítica, el recubrimiento obtenido, como se constató en el apartado referente al estudio de la concentración óptima de Azure A (Apartado 3.1), es el más bajo de todos los estudiados. La disminución en la eficiencia catalítica al aumentar la concentración de la sal de diazonio en la etapa de electroinjerto, parece indicar la existencia de una mayor

dificultad en la transferencia electrónica a través de la película electroactiva al aumentar el espesor o la densidad de la película electroactiva generada. En conclusión, se opta por realizar los estudios de caracterización de la electrocatálisis mediante el electroinjerto de la sal de diazonio del Azure A en concentración 1 mM donde se producen mayores eficiencias catalíticas.

#### **4.2. Efecto del pH en la electrocatálisis de NADH.**

Dada la existencia de protones implicados en la reacción de oxidación del NADH, es importante estudiar la influencia del pH en el comportamiento del sensor; máxime cuando se desean desarrollar metodologías que sean aplicables en dispositivos bioelectrónicos. Por consiguiente, se estudió el comportamiento de electrodos modificados mediante Azure A frente a la oxidación de NADH 1 mM, en un intervalo de pH entre 5 y 8.

Como se observa en la figura 41, se produce un desplazamiento hacia potenciales más negativos al aumentar el pH de trabajo, causado por la existencia de protones implicados en la reacción electroquímica. La mayor intensidad de la corriente catalítica se obtiene a pH 7, lo cual es conveniente puesto que es el pH del medio fisiológico.

La variación del potencial de pico catalítico con el pH es lineal (Fig.41. Inserto B), con un valor en la pendiente de 40 mV, que se aproxima al valor de 30 mV correspondiente a un proceso donde se intercambian dos electrones y un protón ( $2e^- / 1H^+$ ).



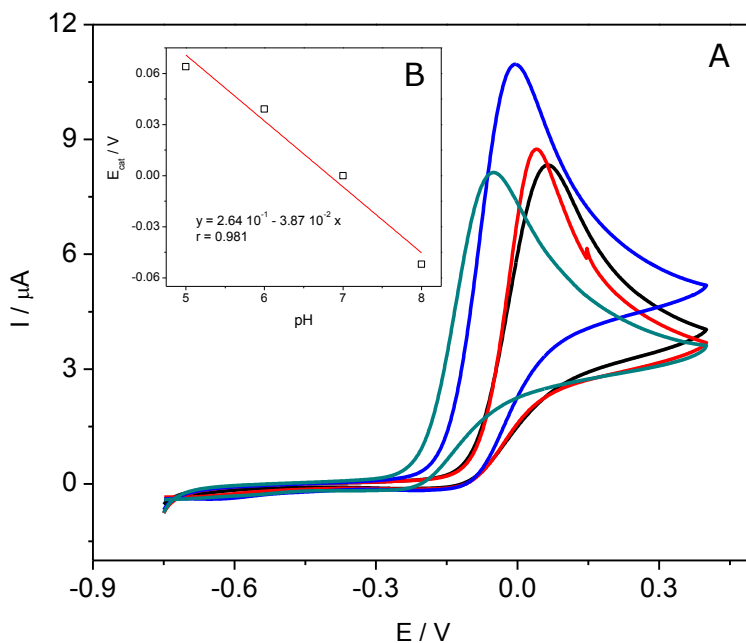


Fig. 41. A) Voltamperogramas cíclicos de la electrooxidación catalítica de NADH 1mM obtenidos a 10 mV/s en tampón acético/acetato 0.1M pH 5.0 (negro), y fosfato 0.1M a pH 6 (rojo), pH 7 (azul) y pH 8 (verde). Inserto B) Representación del potencial formal respecto al pH, obtenida a partir de los voltamperogramas de la figura A.

### 4.3. Cinética de transferencia electrónica en la oxidación electrocatalítica de NADH.

El conocimiento de los procesos que operan en la interfase electrodo modificado-sustrato en un proceso catalítico y del mecanismo por el que se lleva a cabo la electrooxidación de NADH en este tipo de soporte, implica el análisis de las propiedades cinéticas del sensor.

En la figura 42 se recogen los voltamperogramas cíclicos correspondientes al electrodo modificado inmerso en una disolución de NADH 1mM en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a diferentes velocidades de barrido de potencial. El desplazamiento hacia

potenciales más positivos del potencial de pico catalítico al aumentar la velocidad de barrido, nos sugiere la existencia de limitaciones cinéticas en la transferencia de carga entre la película electroactiva de Azure A y el NADH. La representación de la corriente de pico catalítico respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Fig.42.B) muestra una relación lineal, lo que evidencia que el proceso electrocatalítico está limitado por la difusión del NADH hacia la superficie electródica.

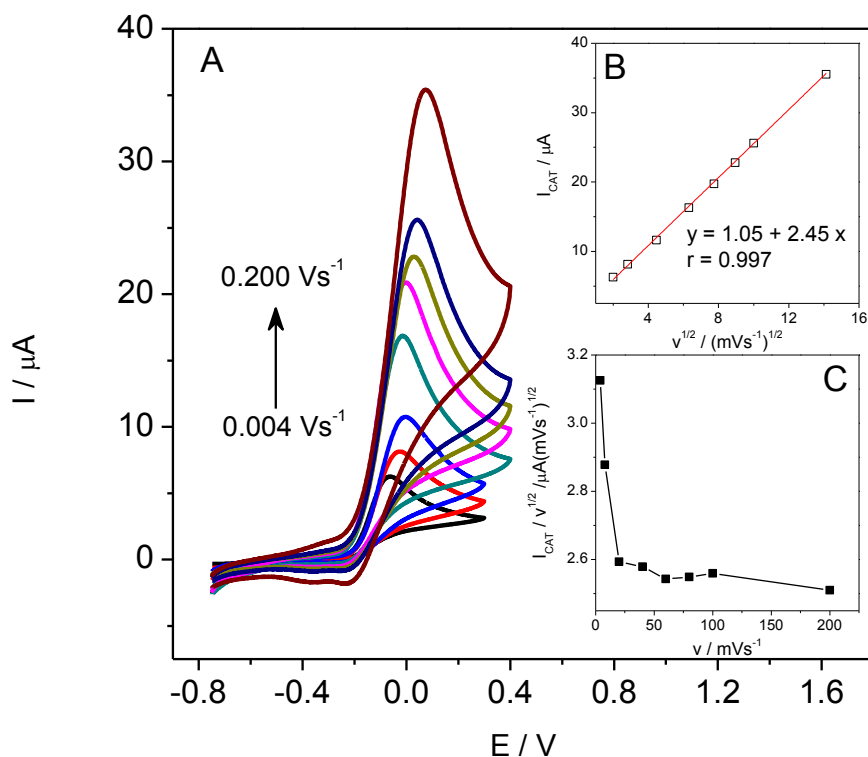


Fig. 42.A) Voltamperogramas cíclicos de la oxidación de NADH 1mM en tampón fosfato pH 7 (0.1M) sobre electrodos modificados con Azure A (1 mM, 5 ciclos) en función de la velocidad de barrido. Inserto B) Representación de la corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Inserto C) Representación de la corriente catalítica normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad en función de la velocidad de barrido.

Por otra parte, en concordancia con Nicholson y Shain [138] la representación de la corriente catalítica normalizada a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, en función de la velocidad de barrido (fig. 42.C) presenta la forma adscrita a un mecanismo EC catalítico, lo que sugiere que la oxidación electroquímica de NADH sobre electrodos modificados mediante electroinjerto de Azure se correspondería a un proceso de este tipo y se puede representar mediante el esquema descrito en la figura 43.

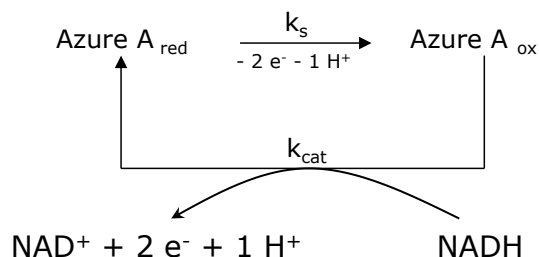


Fig. 43. Esquema del mecanismo catalítico de la oxidación de NADH sobre películas electroactivas de Azure A.

Partiendo de un potencial de  $-0.8 \text{ V}$ , en el cual el Azure A se encuentra en forma reducida, al variar el potencial en el sentido anódico, el Azure A se oxida sobre la superficie del electrodo, proceso rápido y gobernado por la constante  $k_s$ . En presencia de NADH, el Azure A oxida a éste a  $\text{NAD}^+$  en un proceso que implica dos electrones y un protón, gobernado por la constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) regenerándose la forma reducida del Azure A, que volverá a oxidarse en el electrodo iniciándose otra vez el ciclo. Este ciclo catalítico justifica el incremento de la corriente de pico anódica, puesto que la oxidación de NADH regenera la forma reducida del mediador, así como la ausencia de corriente catódica.

#### **4.4. Estudio del coeficiente de difusión del NADH y la constante catalítica mediante el método de Galus.**

Mediante cronoamperometría, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo experimental se han calculado el coeficiente de difusión del NADH y la constante catalítica ( $K_{\text{cat}}$ ) del proceso mediante el método de Galus [132]. El valor del coeficiente de difusión para el NADH en electrodos serigrafados de carbono modificados con películas electroactivas de Azure A, resulto ser de  $(3.6 \pm 0.6) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ; valor próximo al reseñado en la bibliografía de  $(2.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [139].

En la figura 44.A se muestran los valores de eficiencia catalítica en función de la raíz cuadrada del tiempo de medida de la intensidad de corriente, para distintas concentraciones de NADH. La representación posterior de los valores de la eficiencia catalítica normalizada con la raíz cuadrada del tiempo respecto a la raíz cuadrada de la concentración (Fig. 44.B), da lugar a una línea recta de cuya pendiente se obtiene la constante catalítica del proceso. Para el caso de electrodos serigrafados de carbono modificados con películas electroinjetadas de Azure A se obtuvo un valor de  $7.4 \pm 0.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Asimismo, se puede calcular la constante de primer orden de la reacción para una concentración determinada. Por ejemplo, para una concentración de  $6.0 \text{ } \mu\text{M}$  la constante de primer orden arroja un valor de  $4.4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

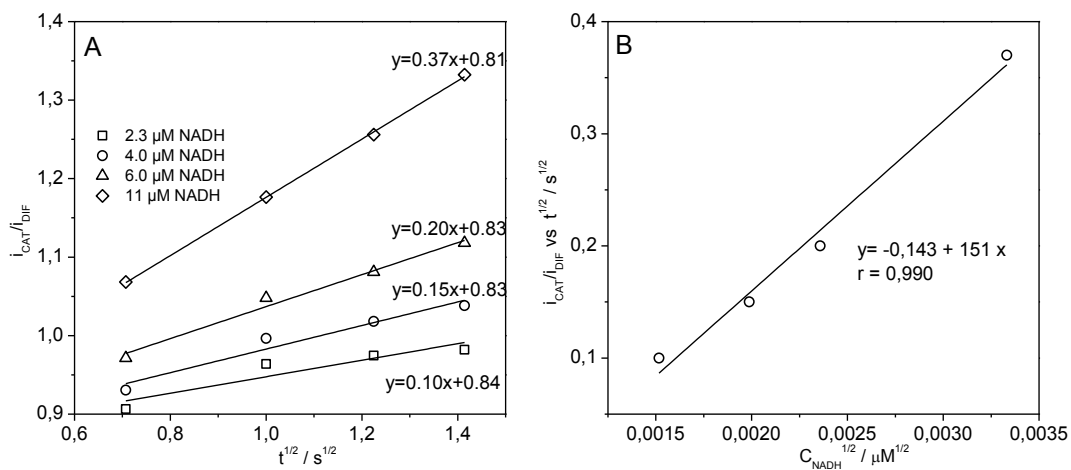


Fig. 44.A) Representación de la eficiencia catalítica del sensor de NADH en función de la raíz cuadrada del tiempo para diferentes valores de concentración de NADH. Fig. 44.B) Representación de Galus de la eficiencia catalítica normalizada con la raíz cuadrada del tiempo en función de la raíz cuadrada de la concentración de NADH. Datos obtenidos de la representación gráfica A.

El valor obtenido confirma que la modificación mediante electroinjerto del mediador redox, Azure A, aporta una alta eficiencia catalítica para la oxidación de NADH. En la bibliografía reciente no se han encontrado datos relativos a la utilización de electrodos modificados mediante electroinjerto de fenotiazinas, o compuestos análogos, en la electrocatálisis de NADH. Por tanto, a efectos comparativos se evaluó la constante catalítica respecto a sensores de NADH modificados mediante otras metodologías. El valor de la constante obtenida en este trabajo es muy superior a los reportados en la bibliografía, como el trabajo desarrollado por Gorton y colaboradores donde se describe la oxidación de NADH sobre un electrodo de pasta de carbono modificado por adsorción de Azul Nilo con una  $K_{cat}$  de  $1.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [140] o el trabajo publicado por McCormac y Dempsey donde se llevó a cabo la preparación de un electrodo PEDOT modificado mediante electropolimerización conjunta

de poliofenol y Tionina, obteniendo un valor para la constante de  $1.86 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [141].

#### **4.5. Propiedades analíticas del sensor de NADH.**

Por último, se han determinado las características analíticas del sensor de NADH desarrollado. Para ello se llevaron a cabo medidas mediante cronoamperometría de un solo pulso de potencial en las condiciones óptimas. Se aplicó un pulso de potencial desde -0.3 V, donde no existe reacción faradaica hasta +0.0 V, potencial al que la reacción de oxidación de NADH sobre los electrodos modificados con Azure A se considera finalizada.

Los cronoamperogramas se obtuvieron para concentraciones crecientes de NADH en tampón fosfato pH 7 (0.1 M) en ausencia de agitación, con el fin de asegurar un control difusional del cofactor hacia la superficie del electrodo. En la figura 45 se aprecia que a los pocos segundos de aplicar el pulso de potencial se alcanza el estado estacionario, esta respuesta rápida del sensor concuerda con el alto valor obtenido para el coeficiente de difusión del NADH. Asimismo se observa que existe una relación lineal entre la corriente de estado estacionario normalizada con el recubrimiento superficial de mediador ( $i_{ss}$ ) y la concentración de NADH en el intervalo de 0.584 a 5.86  $\mu\text{M}$ . Por consiguiente, estos dispositivos pueden utilizarse como sensores amperométricos de NADH.

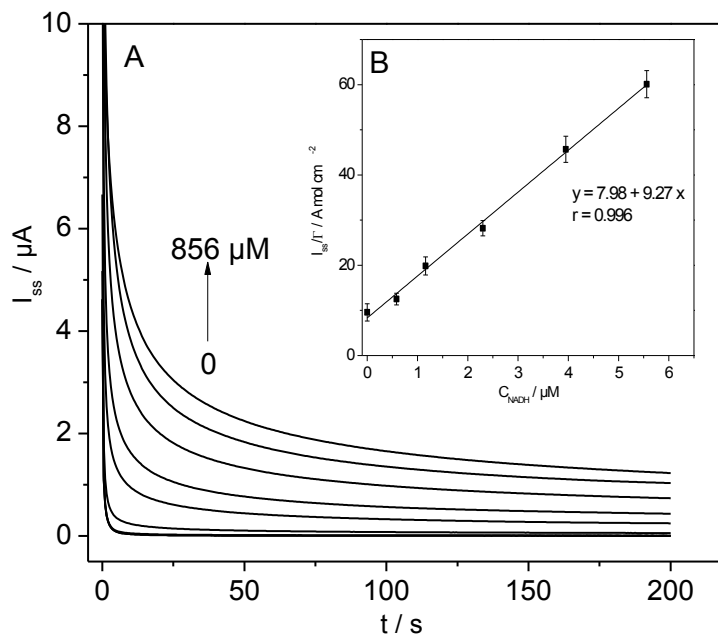


Fig. 45.A) Cronoamperogramas de la oxidación electroquímica de NADH en electrodos serigrafiados de carbono modificados con Azure A. Fig. 45.B) Curva de calibrado obtenida a partir de los cronoamperogramas anteriores.

Tras considerar el hecho de que las medidas cronoamperométricas efectuadas bajo agitación pueden aportar mejores sensibilidades que las llevadas a cabo bajo condiciones de no agitación (Cottrell), dado que se produce un mayor aporte de sustancia electroactiva a la superficie electródica. Se optó por realizar también el estudio cronoamperométrico bajo estas nuevas condiciones. La figura 46.A muestra la curva de calibrado para NADH en el intervalo de concentraciones de 0.660 a 6.25  $\mu M$ .

Una vez realizada la adición de NADH, el tiempo de respuesta del sensor es muy rápido. Tras realizar 5 medidas sobre el mismo electrodo para las concentraciones más altas de NADH ensayadas, se obtuvieron tiempos de respuesta de  $5.6 \pm 0.6$  s.

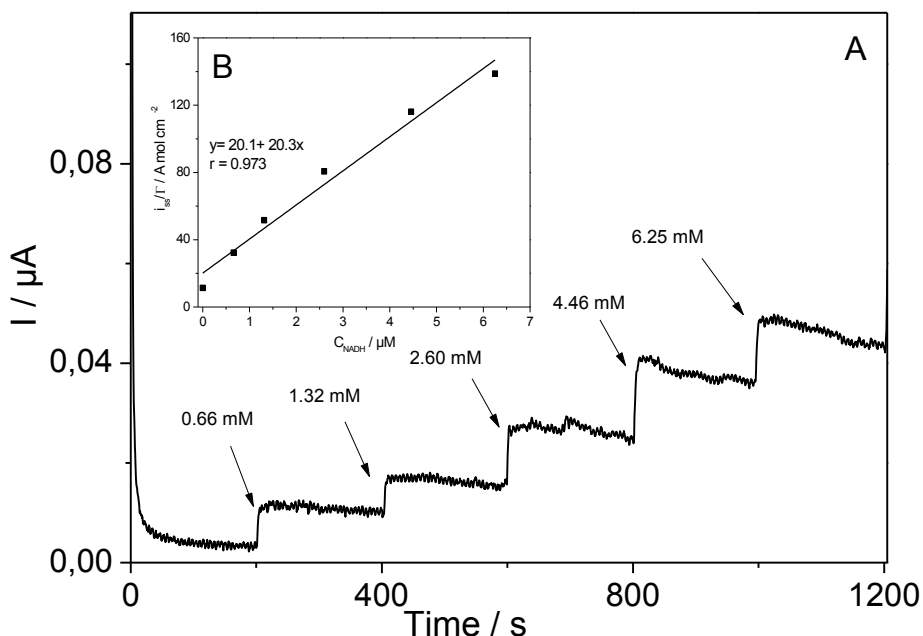


Fig. 46.A) Estudio cronoamperométrico de la electrooxidación de NADH en electrodos de carbono modificados con Azure A bajo condiciones de agitación. Fig. 46.B) Curva de calibrado correspondiente a las adiciones de NADH registradas en el cronoamperograma anterior.

Los parámetros analíticos de ambas metodologías se obtuvieron del primer tramo lineal de la curva de calibrado y se recogen en la tabla 3. El límite de detección y cuantificación se calculó con el criterio  $3\sigma_b/m$  y  $10\sigma_b/m$  para una serie de tres electrodos preparados de igual modo, donde  $\sigma_b$  es la desviación estándar de las señales correspondientes al blanco y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado. El valor de  $\sigma_b$  ha sido calculado sobre una serie de cinco electrodos modificados con películas electroactivas de Azure A sumergidos en disolución tampón fosfato pH 7.0 (0.1M) previamente desoxigenada. El límite de detección y cuantificación obtenido bajo condiciones de agitación fue de 0.12 y 0.59  $\mu\text{M}$  respectivamente;



mientras que en ausencia de ésta se obtuvieron unos valores de 0.57 y 1.90  $\mu\text{M}$ .

Pese a que tanto la sensibilidad del método, como los límites de detección y cuantificación se mejoran considerablemente cuando llevamos a cabo las medidas bajo agitación; estas medidas son fuertemente dependientes de las condiciones experimentales como se deduce de los valores de reproducibilidad obtenidos y del estrecho intervalo de respuesta lineal. La reproducibilidad del método se expresa como el porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD %) y se considera que un método es reproducible cuando el valor de la RSD experimental no supera el valor estimado del coeficiente de variación de Horwitz ( $CV_H$ ) (16) para una concentración dada.

$$CV_H(\%) = 2^{(1-0.5 \cdot \log c)} \quad (16)$$

La reproducibilidad se evaluó comparando las señales analíticas de cinco dispositivos sensores diferentes, preparados del mismo modo, para la misma concentración de NADH (3.95  $\mu\text{M}$ ). De acuerdo con la ecuación (16), el  $CV_H$  se estimó en un 13.0%. Cuando las medidas experimentales se realizaron en agitación se obtuvo un valor de RSD (%) del 12.3%, obteniendo un valor del 6.4% en ausencia de agitación. Dado que los resultados obtenidos para ambas metodologías están por debajo del  $CV_H$ , se garantiza la reproducibilidad del método independientemente de las condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 4. Características analíticas de los electrodos serigrafados de carbón modificados mediante electroinjerto de Azure A para la determinación de NADH.

<i>Condiciones</i>	<i>Sensibilidad</i> ( $\mu\text{A M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	<i>Intervalo lineal</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Límite de detección</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Límite de determinación</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Reproducibilidad</i> (RSD%)
<i>Agitación</i>	9.27	0.584 - 777	$0.57 \pm 0.03$	$1.9 \pm 0.09$	6.4
<i>Sin agitación</i> (Cottrell)	20.1	0.660 - 6.25	$0.12 \pm 0.04$	$0.59 \pm 0.02$	12.4

El sensor de NADH desarrollado mediante el electroinjerto de Azure A muestra unas características analíticas superiores cuando se compara con trabajos reportados en la literatura, donde se utiliza esta fenotiazina como mediador redox. Así, por ejemplo, en el trabajo de Li y colaboradores se llevó a cabo la modificación de un electrodo de carbono mediante la adsorción electrostática de Azure A, logrando un límite de detección (LD) de 30  $\mu\text{M}$  [78], mientras que en trabajos donde se describe la electropolimerización del Azure A sobre electrodos de carbono se obtienen límites de detección en el intervalo de 1.0 a 5.0  $\mu\text{M}$  [142-144]. El análisis de estos valores refleja como el desarrollo de nuevas metodologías de modificación superficial, como la electropolimerización y actualmente el electroinjerto, logran mejorar sustancialmente las propiedades analíticas de los sensores desarrollados.

Asimismo, se ha estudiado la estabilidad del electrodo modificado, para lo cual tras almacenar el electrodo en condiciones ambientales durante 20 días se midió una concentración de NADH 3.95  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato pH 7 (0.1 M) obteniendo una pérdida de actividad del 9%. Igualmente, la respuesta de los electrodos modificados frente a concentraciones elevadas de NADH (0.5 mM) para cinco réplicas muestra una pérdida de actividad menor del 10%. Estos prometedores valores pueden explicarse gracias a la fortaleza

de la unión covalente establecida entre el mediador redox y la superficie electródica, que mejora significativamente la respuesta frente a otros procedimientos de modificación.

Finalmente, se analizó la respuesta del sensor frente a la presencia de interferentes como ácido ascórbico, dopamina, glucosa y acetaminofén (paracetamol) en relación 1:10 (interferente: NADH); observándose que, salvo el ácido ascórbico, no interferían en la respuesta del sensor. El ácido ascórbico a concentración 0.05 mM (relación 1:10) conlleva un aumento en la señal del 70%; no obstante, cuando se redujo su concentración hasta 0.01 mM no se observó ningún efecto.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el sensor desarrollado reúne las propiedades analíticas adecuadas para ser utilizado en la determinación de NADH.



# CAPÍTULO IV

---

**ELECTROINJERTO DE AZURE A  
SOBRE ELECTRODOS DE ORO**



## **1. Electroinjerto de Azure A sobre electrodos de oro.**

Tras llevar a cabo el electroinjerto de películas electroactivas de Azure A sobre electrodos serigrafiados de carbono, se procedió a estudiar este mismo procedimiento sobre electrodos de oro. Se abordó este estudio dada la importancia de la utilización de electrodos de oro en el desarrollo de biosensores y en el ámbito de la nanotecnología. Cabe destacar que en la actualidad existe una escasa bibliografía acerca del electroinjerto de sales de diazonio sobre electrodos metálicos. Pinson y colaboradores en 2001 [56] pusieron de manifiesto la capacidad de electroinjerto de distintas sales de diazonio, preparadas en medio aprótico, en superficies de hierro. Posteriormente, Vautrin y Podvorica extendieron este procedimiento de modificación a un mayor número de superficies metálicas como zinc, níquel, oro, cobalto, cobre y platino [51].

El mecanismo de electroinjerto de Azure A en electrodos de oro es análogo al descrito para superficies de carbón, pese a que en los primeros trabajos se postuló la formación de enlaces tipo Au-N=N-C [55] o incluso Au-O-C [56] entre la superficie y la molécula electroinjertada. Como se describió en el capítulo de introducción, la existencia de técnicas de análisis de superficies mucho más sensibles han demostrado la existencia de enlace directo Au-C debido al electroinjerto de la molécula de 4-nitrobenzenodiazonio y la superficie de oro [57].

El electroinjerto de la fenotiazina sobre la superficie electródica de oro, se realizó siguiendo la metodología descrita en el procedimiento experimental. En el voltamograma cíclico de la figura 47. A, en el barrido de potencial catódico se observa un pico ancho centrado en un potencial de +0.21 V, debido a la reducción del grupo diazo formado tras la reacción de diazotación y un proceso más débil

a +0.13 V que se asigna a la reducción de la fenotiazina. En el barrido anódico aparece un pico a +0.32 V que se asigna a la oxidación de la fenotiazina injertada sobre la superficie del electrodo. Asimismo, se aprecia una disminución de la intensidad de pico tanto en el barrido anódico como en el catódico en sucesivos ciclos de potencial, este hecho indica la formación de una película menos conductora de material sobre la superficie del electrodo de oro.

Con el fin de comprobar el efecto de la reacción de diazotación del Azure A y hasta qué punto la adsorción directa de dicha fenotiazina contribuye al proceso voltamperométrico, se realizó un experimento similar pero en ausencia del agente causante de la diazotación, el nitrito sódico; los resultados se muestran en la figura 47.B. Se observa un proceso redox en el barrido anódico a +0.22 V y en el catódico a +0.13 V, que corresponden a la oxidación y reducción de la fenotiazina sobre el electrodo de oro, respectivamente. En este caso, la intensidad de pico tanto anódica como catódica se mantiene invariable al aplicar sucesivos ciclos de potencial, excepto en el primer ciclo. Lo que indica que no se está depositando nuevo material sobre la superficie electródica al aplicar barridos cíclicos de potencial sucesivos.



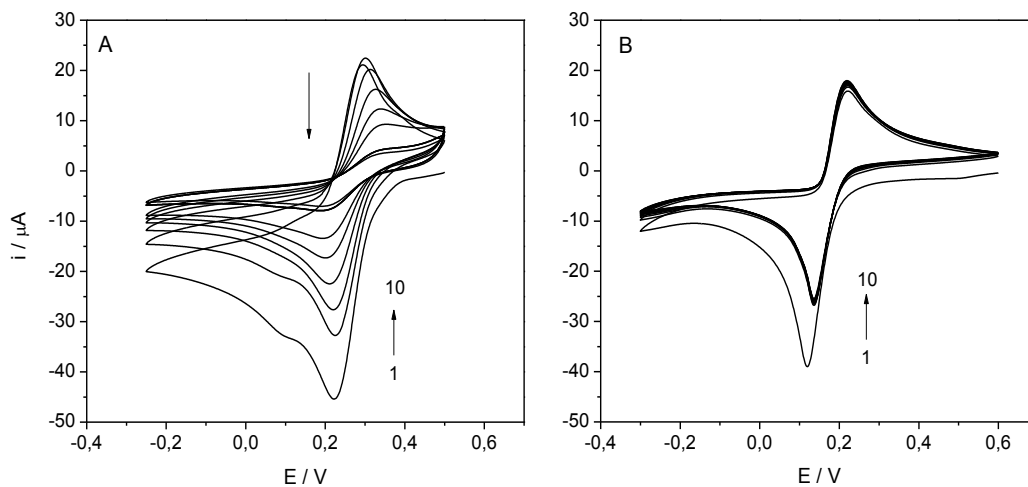


Fig. 47. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al electroinjerto de Azure A (5 mM) sobre electrodos de oro (10 ciclos, 100mV/s) en el electrodo diazotado (A) y sin diazotar (B) en medio HCl 0.1M.

Posteriormente, se registró la respuesta mediante voltamperometría cíclica de ambos electrodos modificados en tampón fosfato pH 7 (0.1M) y ausencia de especie electroactiva. En la figura 48 se observa que el electrodo modificado mediante electroinjerto presenta en el barrido catódico dos procesos: el primero de ellos centrado en -0.06 V se corresponde con la reducción de la fenotiazina injertada sobre la superficie electródica; mientras que el segundo proceso, centrado en -0.21 V, se corresponde con la reducción del Azure A adsorbido sobre el electrodo de oro. Esta última asignación, se comprueba al observar el potencial al que aparece dicho proceso en el voltamperograma obtenido en ausencia de electroinjerto (línea negra). Por otra parte, en el barrido anódico en ambos casos aparece un único pico centrado +0.14 V debido a la oxidación del Azure A adsorbido sobre la superficie del electrodo de oro.

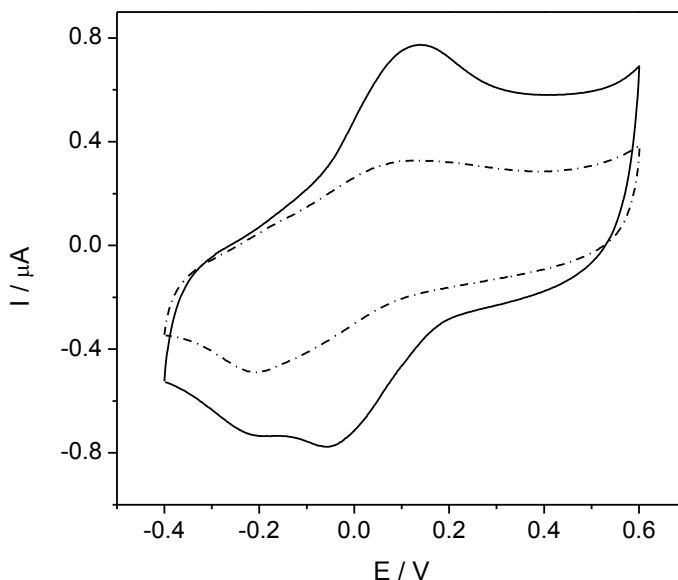


Fig. 48. Voltamperogramas cíclicos (ciclo número 20) de los electrodos de disco de oro modificados con Azure A (10 mM) diazotado (línea continua) y sin diazotar (línea discontinua) obtenidos en tampón fosfato pH 7 (0.1 M) a 100mV/s.

Como se aprecia en la figura anterior, la respuesta del electrodo de oro modificado con Azure A es significativamente mayor cuando la modificación se ha llevado a cabo mediante electroinjerto que cuando se realiza por adsorción. Este comportamiento es análogo al obtenido sobre electrodos serigrafiados de carbono, donde la respuesta electroquímica del electrodo modificado tras el electroinjerto de Azure A era claramente superior. Los resultados obtenidos confirman que el procedimiento de modificación electródica mediante la electroreducción de la sal de diazonio de Azure A, o electroinjerto, suponen un procedimiento más eficaz de modificación de superficies electródicas con Azure A independientemente del material utilizado como soporte electródico.

## **2. Optimización de las condiciones de electroinjerto.**

### **2.1. Efecto de la concentración de la sal de diazonio en la etapa de electroinjerto.**

Una vez se comprobó experimentalmente que era posible realizar el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre superficies electródicas de oro, se procedió a optimizar las condiciones experimentales. En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración de fenotiazina en la etapa de electroinjerto. Para ello, se modificaron dos electrodos de oro con dos concentraciones diferentes de Azure A diazotado, 5 y 10 mM. Al igual que en el caso de los electrodos serigrafados de carbono se evaluó la estabilidad del dispositivo resultante. En la figura 49 se muestra que cuando el procedimiento de electroinjerto se lleva a cabo con una concentración de 10 mM (cuadrados), como era de esperar se obtiene un recubrimiento inicial muy superior al obtenido con 5 mM (círculos). Sin embargo, al estudiar la estabilidad de la película, se aprecia que tras la aplicación de los 50 primeros ciclos de potencial el electrodo modificado con una concentración de 10 mM presenta una disminución muy acusada del recubrimiento superficial, situándose ésta en un 35 % del material de partida y en un 60 % tras 200 ciclos. No obstante, cuando el electrodo se modifica con una concentración de 5 mM, la pérdida de material en los primeros 50 ciclos es de tan solo el 20%, y del 32% tras 200 ciclos continuos de potencial.

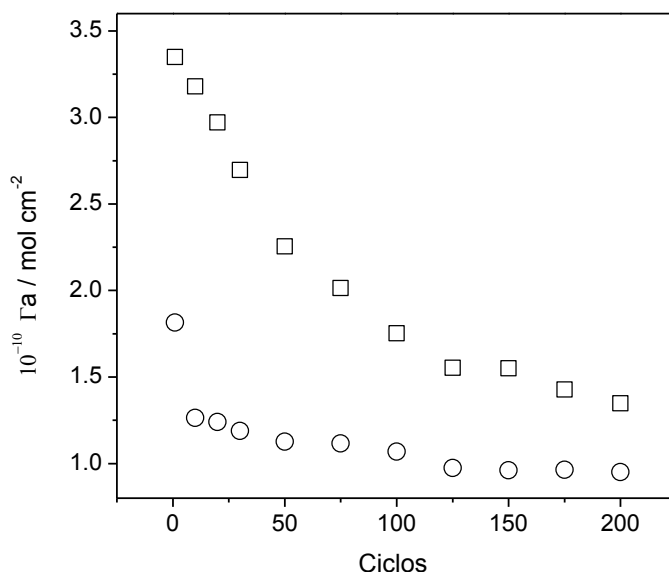


Fig. 49. Estabilidad de los electrodos de oro modificados con Azure A en concentración 10 mM (cuadrados) y 5 mM (círculos) en la etapa de electroinjerto. Medidas realizadas aplicando 200 ciclos de potencial sucesivos en tampón fosfato pH 7 (0.1M)

Estos resultados indican que llevar a cabo el procedimiento de electroinjerto con una concentración mayor conlleva una menor estabilidad del electrodo modificado obtenido. La pronunciada pérdida del recubrimiento durante los primeros ciclos que se observa cuando el electrodo ha sido modificado con 10 mM de Azure A puede estar causada por la presencia de un mayor número de moléculas de Azure A débilmente enlazadas a la superficie electródica. Dado que estas moléculas no están enlazadas covalentemente a la superficie electródica, presentan un comportamiento lábil frente al ciclado continuo de potencial y por tanto se desorben con facilidad, provocando una disminución brusca del recubrimiento superficial. Este comportamiento puede estar motivado porque el número de ciclos aplicados en la etapa de electroinjerto sea insuficiente para electroinjetar la cantidad de moléculas de Azure A necesarias para

cubrir toda la superficie electródica, de este modo se ve favorecida la adsorción de moléculas sobre la superficie electródica respecto al electroinjerto.

En base a los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad del dispositivo, se eligió una concentración de Azure A de 5 mM para llevar a cabo la modificación del electrodo de oro.

## **2.2. Optimización del número de ciclos de electroinjerto.**

Una vez evaluada la concentración adecuada de Azure A en la etapa de electroinjerto, se estudió el número de ciclos de potencial óptimo a aplicar. Para ello, se modificó una serie de electrodos de oro, mediante la aplicación de un número de ciclos de potencial creciente en la etapa de electroinjerto; en un intervalo que comprende de 5 a 100 ciclos. Posteriormente se registró su imagen ciclovoltamperométrica en tampón fosfato pH 7 (0.1 M) y ausencia de especie electroactiva. En la figura 50 se representa el recubrimiento superficial calculado frente al número de ciclos de electroinjerto aplicados. Se puede observar que el recubrimiento de la superficie electródica aumenta linealmente al incrementarse el número de ciclos de electroinjerto hasta un máximo de  $7.4 \cdot 10^{-10}$  mol $\cdot$ cm $^{-2}$ , valor que se alcanza para 75 ciclos. A partir de dicho valor no se produce el injerto de nuevas moléculas de Azure A alcanzándose, por tanto, la saturación de la superficie electródica. Este valor de recubrimiento se corresponde con la mitad del recubrimiento teórico para una monocapa de material respecto al valor calculado por Pinson de  $13.5 \cdot 10^{-10}$  mol $\cdot$ cm $^{-2}$ . Si se tiene en cuenta este valor teórico, se puede suponer bien que la formación de la monocapa de Azure A sobre la superficie de oro no ha sido completa, alcanzándose un recubrimiento superficial para

condiciones de saturación de electroinjerto del 50 %, o bien que el procedimiento de electroinjerto depende en gran medida de la naturaleza de la superficie electródica y de las posiciones activas de ésta, siendo entonces necesario considerar cada caso de manera aislada. Alcanzar condiciones de saturación en el crecimiento de la película con recubrimientos superficiales del 50% parecen condiciones mutuamente excluyentes, por tanto se considera que el análisis del procedimiento de electroinjerto sobre electrodos de oro merece un estudio más profundo de las propiedades y estructura de la película electroinjertada. Con el fin de alcanzar este objetivo será necesario utilizar técnicas instrumentales complementarias que permitan caracterizar el crecimiento de la película de manera más completa.

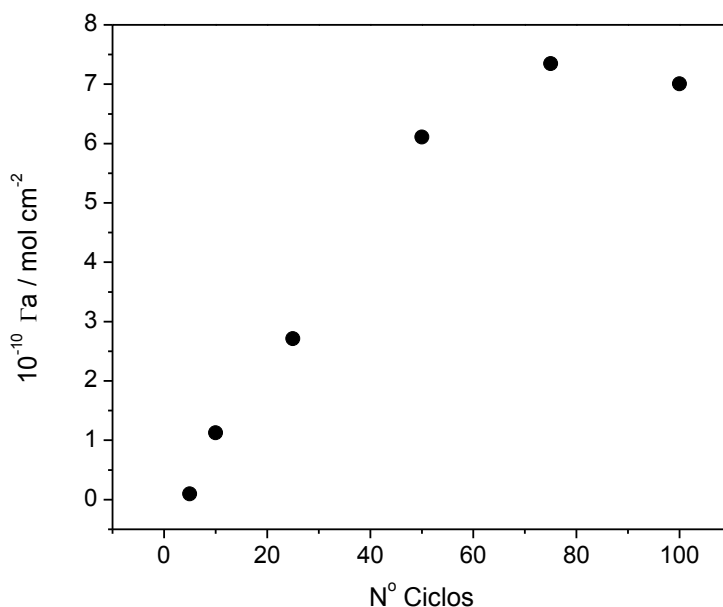


Fig. 50. Recubrimiento superficial de los electrodos modificados en función del número de ciclos de electroinjerto de Azure A (5mM) aplicados.

El crecimiento de la película electroactiva, como se ha visto anteriormente, está limitado por el bloqueo progresivo de la superficie electródica. Esta saturación de la superficie electródica puede producirse bien por la formación de una monocapa de Azure A compacta, o bien por la formación de multicapas de material sobre la superficie electródica. Existen ciertas discrepancias en la literatura acerca de cuál de los modelos que explican el crecimiento de películas electroinjertadas es más acertado. Autores como A. Downard o J. Pinson [12, 145], postulan que en primer lugar se produce la formación de una película de material electroinjertado incompleta, caracterizada por un elevado número de defectos y canales (pinholes). Posteriormente, al incrementarse el número de ciclos de potencial o bien el tiempo de electrodeposición, esta película se va completando con nuevas moléculas que se electroinjertan sobre la superficie libre del electrodo, dando lugar a una monocapa compacta donde las moléculas están constreñidas y sin posibilidad de rotación. Por el contrario, autores como McCreery y McDermott [65, 146] afirman que el modelo de crecimiento de películas electrogeneradas más plausible se basa en la formación de multicapas de material. Análogamente a lo descrito en la hipótesis anterior, durante los primeros ciclos de electroinjerto la superficie del electrodo se va recubriendo poco a poco con moléculas de material, formándose una monocapa con un elevado número de defectos. Cuando los nuevos radicales electrogenerados encuentran un impedimento mayor para formar un enlace covalente sobre la superficie del electrodo, se produce el ataque de un radical sobre una molécula previamente electroinjertada dando lugar a la formación de multicapas de material.

El mecanismo por el que se produce la formación de multicapas se corresponde con una reacción de sustitución aromática homolítica ( $S_H$ ). De acuerdo con el esquema de la figura 51, esta

reacción cursa por el ataque de un radical arilo, generado mediante la electroreducción de la sal de diazonio, sobre el anillo aromático previamente electroinjertado de modo que se genera un radical ciclohexadienilo. Posteriormente, se produce la pérdida de un átomo de hidrogeno, bien por abstracción del átomo de hidrogeno por otro radical o bien liberándose un protón y un electrón, recuperándose de este modo la aromaticidad del anillo.

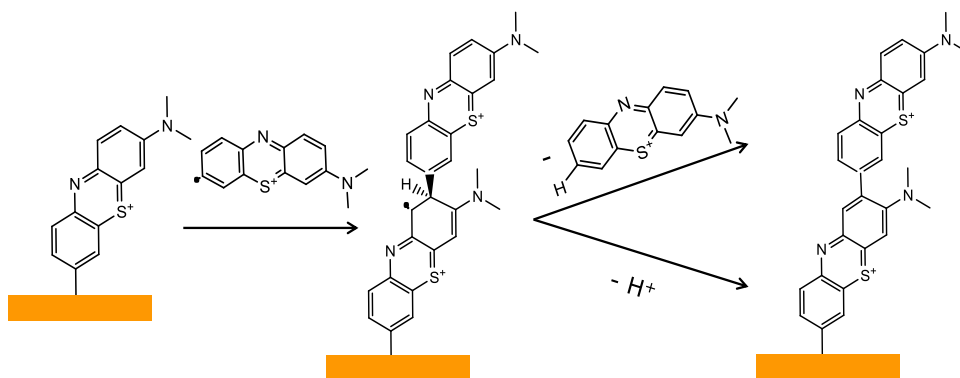


Fig. 51. Esquema del mecanismo de formación de multicapas mediante la reacción de sustitución aromática homolítica (S<sub>H</sub>) para compuestos diazoderivados.

En la bibliografía actual no se han encontrado estudios que describan detalladamente el mecanismo de crecimiento de las películas electroactivas de Azure A, o compuestos análogos. Es necesario, por tanto, llevar a cabo el estudio de la formación, así como de la estructura y propiedades de la película electrogenerada mediante técnicas como la elipsometría espectroscópica, la microscopía electroquímica de barrido (SECM) y la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) que aporten mayor información.



### **3. Estudio del espesor de la película electroinjertada de Azure A mediante elipsometría.**

En el año 2004, el profesor J.M. Tour publicó el primer trabajo en el que se utilizó la elipsometría como técnica para calcular el espesor de una película generada mediante la reducción electroquímica de sales de diazonio sobre superficies de silicio, paladio y arseniuro de galio [54].

Como se ha descrito previamente en el procedimiento experimental, la elipsometría es una técnica instrumental que permite estimar el espesor de un recubrimiento. Para ello se mide la diferencia existente en la amplitud ( $\Psi$ ) y fase ( $\Delta$ ) del haz incidente respecto al haz reflejado por el recubrimiento, esta diferencia está directamente relacionada con el índice de refracción y por tanto con el espesor del recubrimiento.

En colaboración con el grupo de "Electrónica y Semiconductores" del departamento de Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, dirigido por el Profesor Juan Piqueras Piqueras, se han realizado medidas experimentales mediante elipsometría espectroscópica de las superficies de oro modificadas mediante electroinjerto de Azure A. De este modo se pretende discernir si el crecimiento de la película de Azure A se produce bien mediante la formación de una monocapa compacta de material o bien a través de multicapas.

Tras realizar el acondicionamiento de las placas de oro, como se describe en el procedimiento experimental, se llevó a cabo la modificación mediante electroinjerto con 10 y 100 ciclos. Una vez modificadas, las placas se dispusieron sobre el equipo de elipsometría y se realizaron las medidas elipsométricas tanto antes como después del procedimiento de electroinjerto obteniéndose la variación de los

parámetros elipsométricos amplitud ( $\Psi$ ) y fase ( $\Delta$ ) en función de la energía del haz incidente. En la figura 52, se puede observar que cuando la placa ha sido modificada mediante 10 ciclos (círculos) apenas existen diferencias en  $\Psi$  y  $\Delta$  respecto a la placa de oro sin modificar (cuadrados). Por el contrario, cuando se aplicaron 100 ciclos de electroinjerto (triángulos) se observan diferencias apreciables en las componentes  $\Psi$  y  $\Delta$  del haz respecto a la placa sin modificar o modificada con 10 ciclos. Este hecho indica que cuanto mayor es el número de ciclos de electroinjerto, mayor es la diferencia en las componentes paralela y perpendicular del haz y, por tanto mayor es el espesor del recubrimiento del material depositado sobre la superficie.

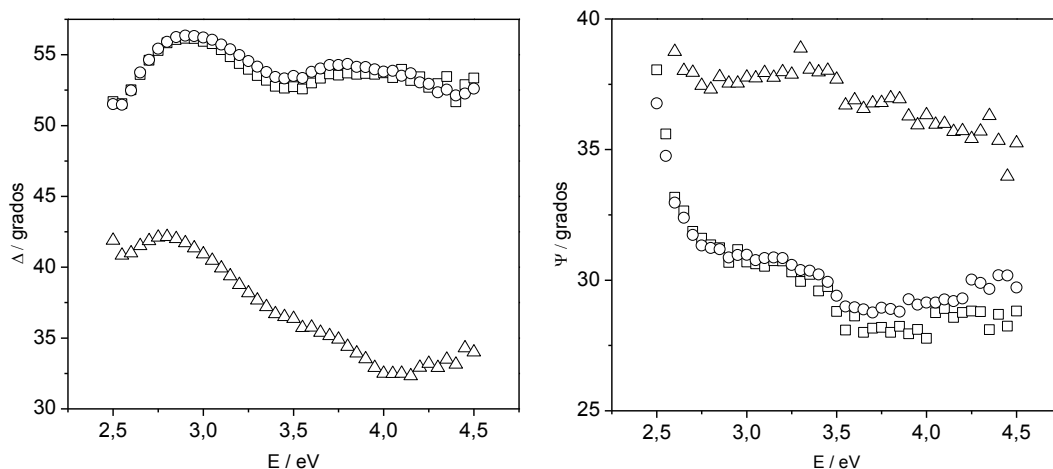


Fig. 52. Variación de las funciones elipsométricas  $\Delta$  y  $\Psi$  en función de la energía del haz incidente antes (cuadrados) y tras el electroinjerto de Azure A (5 mM, 100 mVs<sup>-1</sup>) con 10 (círculos) y 100 (triángulos) ciclos.

Posteriormente se llevó a cabo el tratamiento de los datos obtenidos, puesto que tanto los valores de las constantes ópticas como del espesor no se obtienen directamente, sino que es necesario establecer un modelo que permita extraer información analítica a través de las variaciones de  $\Psi$  y  $\Delta$ . Este proceso se realiza mediante simulaciones en base a modelos teóricos. En el caso que nos ocupa, la naturaleza de la estructura a estudiar se corresponde con estructuras tipo ambiente / película / sustrato. El modelo escogido para llevar a cabo la simulación ha sido el modelo de oscilador de Lorentz mediante la aproximación de Maxwell-Garnett (MG) para una única capa, que se esquematiza en la figura 53.

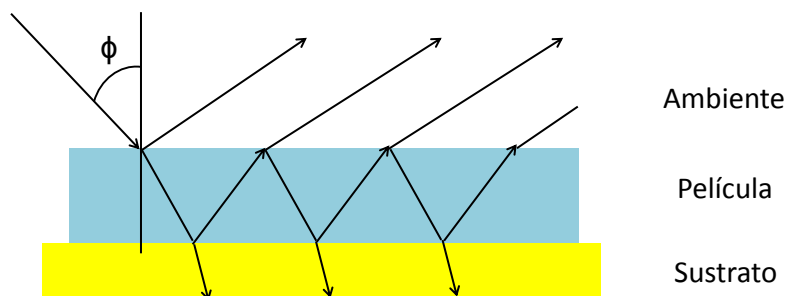


Fig. 53. Esquema los fenómenos de interacción de la radiación incidente y reflejada por la película de Azure A sobre una placa de oro.

Si el crecimiento de la película de Azure A se adscribiera a un proceso de monocapa compacta, el espesor de la película se correspondería aproximadamente a la altura de la molécula de Azure A, mientras que si se produce la formación de multicapas el espesor de la película obtenida será mayor. Los datos obtenidos de la simulación, asumiendo un recubrimiento teórico del 100% de la superficie, reflejan que la placa de oro modificada con 100 ciclos de electroinjerto de Azure A presenta un espesor de 20 nm. Según cálculos teóricos realizados mediante programas de modelización molecular (Gaussian 09 y GaussView 05) la altura de una molécula

de Azure A corresponde a un valor aproximado de 12 Å. Por consiguiente, el espesor aproximado calculado para la película de Azure A sobre superficies metálicas de oro se correspondería con 17 monocapas de material.

Se puede concluir, por tanto, que el espesor calculado mediante elipsometría espectroscópica explica las anomalías de los datos obtenidos mediante voltamperometría cíclica y confirma el hecho de que el crecimiento de las películas electroactivas de Azure A se lleva a cabo mediante un proceso de formación en multicapas según se describe en el esquema de la figura 51.

#### **4. Estudio del procedimiento de electroinjerto de Azure A mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM).**

La microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo es una técnica muy útil para estudiar *in situ* procesos electroquímicos interfaciales que ocurren en la interfase electrodo-disolución como por ejemplo la electrodeposición de metales, la adsorción de electrolitos o la formación de películas electrogeneradas. La variación en la frecuencia de resonancia del cristal debida a fenómenos de deposición/adsorción, permite obtener información cuantitativa de los cambios de masa que tienen lugar en la superficie del electrodo del oscilador de cuarzo mediante la aplicación de la ecuación de Sauerbrey (4) [67].

$$\Delta F = -C_f \cdot \Delta m \quad (4)$$

Donde  $\Delta F$  es la variación de frecuencia de oscilación del cristal asociada a la variación en la masa depositada  $\Delta m$ , y  $C_f$  es el la constante que engloba las características del cristal. En la actualidad,

esta técnica se utiliza en la caracterización de películas electroinjertadas, ya que permite monitorizar la variación de la frecuencia de oscilación y de la resistencia del cristal de manera simultánea a la aplicación de los ciclos de potencial. En la figura 54.A se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a la etapa de electroinjerto de Azure A sobre la superficie de oro del oscilador de cuarzo utilizado como electrodo. Los voltamperogramas recogidos en la figura 54.A, muestran un comportamiento análogo a los obtenidos sobre electrodos de disco de oro utilizados con anterioridad (figura 47.A). Al igual que en los voltamperogramas previos, se observa una disminución de la corriente de pico tanto anódica como catódica al aumentar el número de ciclos de potencial.

La variación en la frecuencia de oscilación que sufre el cristal de cuarzo permite no solo confirmar el proceso de deposición de material sobre la superficie del oscilador a medida que progresa la reacción electroquímica, sino también cuantificar la cantidad de material depositado en el electrodo. En la figura 54.B, se observa que la variación de la frecuencia tras cada ciclo no es uniforme, en los primeros ciclos de electroinjerto se produce una disminución mayor que en posteriores ciclos, debido probablemente a una mayor área disponible para el electroinjerto. Asimismo, dicha disminución de la frecuencia se produce solo durante la aplicación del barrido de potencial de reducción (de +0.6 V a -0.2 V), indicando que es en reducción donde se deposita material debido al electroinjerto de Azure A sobre la superficie electródica.

En la figura 54.C, se observa como el valor de la resistencia del circuito equivalente que describe la microbalanza aumenta en el barrido catódico, que se corresponde con la electroreducción del Azure A; mientras que en el barrido anódico no se aprecia un incremento significativo. Como se ha descrito en el apartado experimental, la resistencia es una medida de la disipación de la

energía del oscilador. El aumento en la resistencia durante la aplicación de los ciclos de electroinjerto implica una mayor disipación de la energía del oscilador, fenómeno que está relacionado con la formación de películas con propiedades viscoelásticas, en general poco rígidas o con gran espesor.

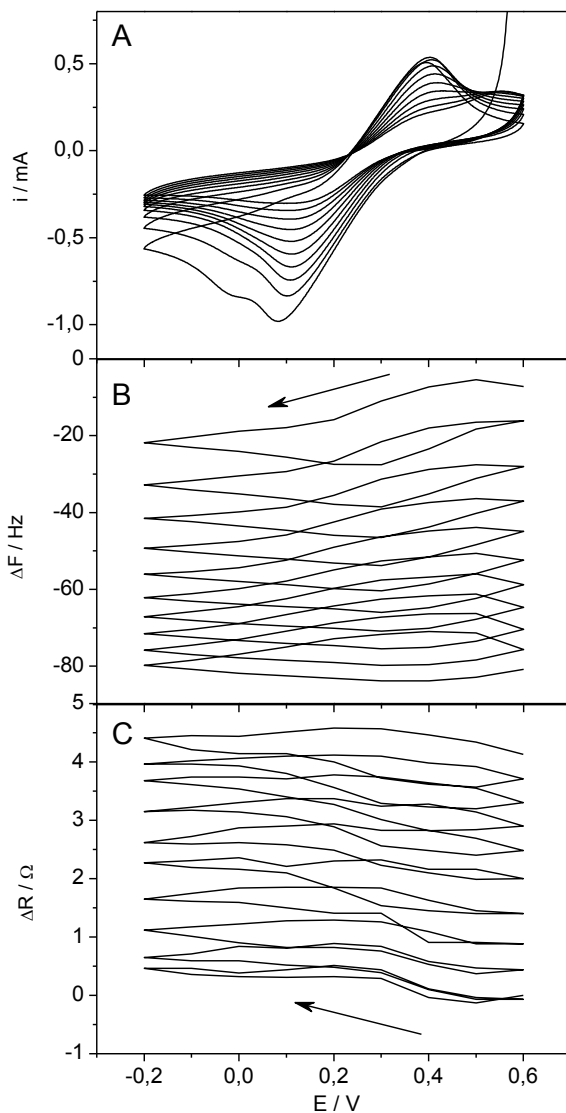


Fig. 54.A) Voltamperogramas cíclicos correspondientes al electroinjerto de Azure A sobre el electrodo de oro de un oscilador de cuarzo (5 mM, 10 ciclos, 100 mV/s). Fig.

54.B) y 54.C) Variación de la frecuencia de resonancia y de la resistencia del oscilador de cuarzo durante el procedimiento de electroinjerto de Azure A.

La monitorización continua e *in situ* de la variación de la frecuencia y de la resistencia del oscilador durante el procedimiento de electroinjerto permite estudiar no solo la cinética de formación de la película electroactiva, sino también las propiedades de la película de Azure A generada. En la figura 55.A y 55.B se muestran las gráficas correspondientes a la variación de la frecuencia y de la resistencia en función del número de ciclos de electroinjerto. Como se puede observar en la figura 55.A, durante los primeros 20 ciclos de electroinjerto se produce una disminución en la frecuencia de 95 Hz, lo que equivale al 75% del total. La brusca disminución en la frecuencia del cristal, observada durante los primeros ciclos, se asocia al electroinjerto de las moléculas de Azure A producido tanto en las posiciones vacantes de la superficie electródica como sobre moléculas de Azure A previamente injertadas, que da lugar a la formación de multicapas. Posteriormente, según se incrementa el número de ciclos de electroinjerto la frecuencia alcanza un valor constante. A partir del ciclo número 50 apenas se observa una disminución significativa, indicando que no se electroinjertan nuevas moléculas y por tanto se ha alcanzado la saturación en el crecimiento de la película electroactiva. Esta autoinhibición del crecimiento de la película de Azure A puede estar promovida por una disminución en la transferencia electrónica a través de la película que imposibilita la generación de nuevos radicales de Azure A, tal como indican Noel y colaboradores [147].

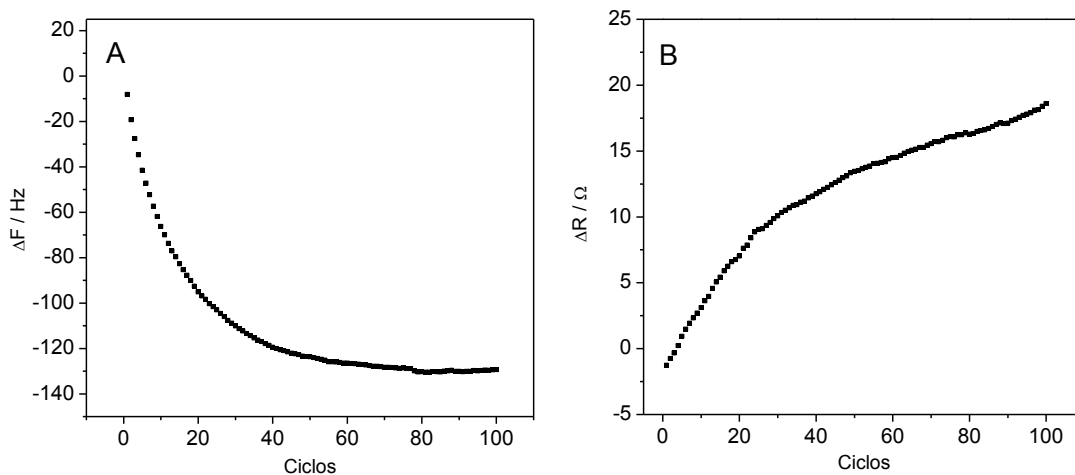


Fig. 55.A) y B). Variación de la frecuencia de resonancia y de la resistencia obtenida en función del número de ciclos aplicados en el electroinjerto de Azure A (5 mM, 100  $\text{mVs}^{-1}$ ) sobre electrodos de oro.

En la figura 55.B se observa como la resistencia aumenta con el número de ciclos de electroinjerto. Este tipo de comportamiento es indicativo de que la película depositada puede presentar propiedades viscoelásticas. El análisis de la frecuencia y de la resistencia (o de la disipación) como parámetros independientes no permite describir el sistema en su totalidad, puesto que no contempla la variación de las propiedades viscoelásticas de la película debida al aumento del espesor de la misma. Por ello, Lucklum y colaboradores [148] describieron un método que permite evaluar tanto la contribución gravimétrica, debida a la deposición de material en la superficie del electrodo, como la no gravimétrica, debida a las variaciones en el módulo de elasticidad de la película, mediante el análisis del cociente entre la resistencia del oscilador y la frecuencia,  $\Delta R/\Delta F$ . En la figura 56 se representa ésta relación en función del número de ciclos de potencial en la etapa de electroinjerto. En la gráfica se pueden apreciar dos tendencias, durante los primeros 20 ciclos de electroinjerto se produce un incremento lineal en la relación



resistencia/frecuencia, lo que indica que las moléculas de Azure A electroinjetadas durante los primeros ciclos presentan interacciones laterales intermoleculares débiles, esto se asocia con un comportamiento claramente viscoelástico. Conforme se van incrementando el número de ciclos y se van depositando más capas, la película comienza a denotar otro tipo de comportamiento donde la variación de la resistencia no es tan evidente, el punto crítico se alcanza para un valor de 50 ciclos, a partir de este punto el cociente entre la resistencia del oscilador y la frecuencia alcanza un valor constante, lo que denota un cambio en el comportamiento de la película en términos de viscoelasticidad. Los datos recogidos parecen indicar que a medida que se produce el crecimiento en multicapas, se produce una mayor interacción lateral entre las moléculas de Azure A, lo que da lugar a un material más rígido, haciendo que la película electroactiva adquiera un acoplamiento con el oscilador de cuarzo de tipo elástico.

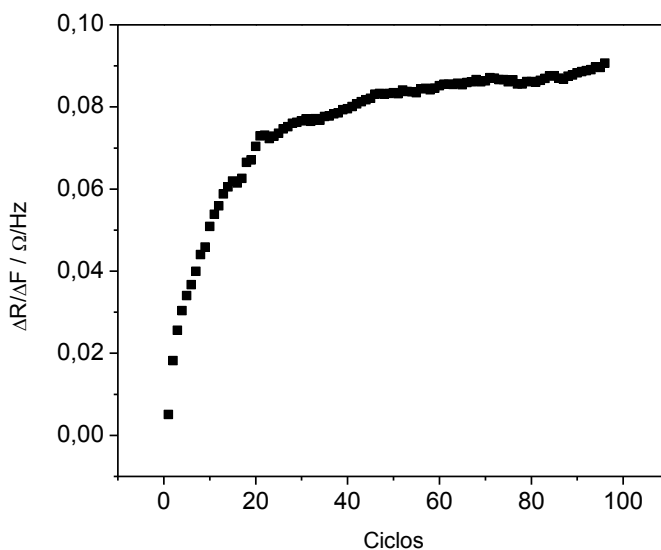


Fig. 56. Gráfica de la variación del parámetro  $\Delta R/\Delta F$  en función del número de ciclos de electroinjetado de Azure A para un electrodo de oro.

La película electroinjertada de Azure A presenta dos regímenes respecto a su comportamiento viscoelástico. En el primero de ellos la película presenta un comportamiento claramente viscoelástico, entonces la ecuación de Sauerbrey deja de tener validez, por lo que no sería posible cuantificar la cantidad de material depositado sobre la interfase electródica. Por otro lado, cuando se superan los 50 ciclos el acoplamiento entre el oscilador y la película es de tipo elástico, bajo estas condiciones es posible aplicar la ecuación de Sauerbrey y por tanto se puede estimar la cantidad de material depositado.

## **5. Influencia del espesor de la película de Azure A sobre la transferencia electrónica.**

### **5.1. Estudio mediante Microscopía de Barrido Electroquímico (SECM).**

Los resultados obtenidos en los estudios de microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) parecen indicar que al aumentar el número de ciclos de electroinjerto y con ello el espesor de la película, se produce un cambio en las propiedades que podrían afectar a la transferencia electrónica a través de la misma.

La microscopía de barrido electroquímico (SECM) es una técnica de caracterización que se fundamenta en la medida de la corriente debida a una reacción electroquímica en un (ultra)microelectrodo utilizado como punta del microscopio. La SECM es una técnica utilizada fundamentalmente para estudiar el comportamiento electroquímico local de interfases líquido/sólido, líquido/gas y líquido/líquido. Es complementaria de otras técnicas de caracterización superficial como la microscopía de fuerza atómica

(AFM), la resonancia de plasmón superficial (SPR), o la microscopía de efecto túnel (STM). Además de proporcionar información topográfica se utiliza para sondear la reactividad en la superficie de materiales electrocatalíticos o la actividad enzimática de enzimas inmovilizadas en una superficie [149].

En el presente trabajo, esta técnica, se ha utilizado con el propósito de evaluar la propiedad conductora/aislante en cuanto a transferencia electrónica de la superficie electródica modificada con Azure A. Para ello se han obtenido las curvas de aproximación entre la punta del microscopio y la superficie. La curva de aproximación es una medida de la variación de la intensidad de corriente que se establece entre la punta del (ultra)microelectrodo y la película electroinjertada, en presencia del par redox Fe(II)/Fe(III), al disminuir la distancia existente entre ambas. Cuando la distancia entre la punta del microelectrodo y la superficie es muy pequeña se establece un fenómeno denominado retroalimentación (ó feedback), que permite evaluar las propiedades respecto a la transferencia electrónica de la película.

El mecanismo por el cual se explica el fenómeno de retroalimentación se muestra en la figura 57. El Fe (II) presente en la celda electroquímica se oxida a Fe (III) debido al potencial aplicado en la punta del microscopio. Si el sustrato es capaz de transferir electrones al Fe (III) y se encuentra a un potencial más catódico que el correspondiente al par redox del sistema Fe (III) / Fe (II); el Fe (III) generado en la punta será reducido gracias al sustrato, regenerando la especie inicial, el Fe (II), y cerrando el ciclo. Este efecto se conoce como retroalimentación positiva (o feedback positivo) y conlleva un aumento en la intensidad de la corriente medida en la punta cuando se disminuye progresivamente la distancia entre la punta y el sustrato. Por el contrario, cuando el sustrato presenta propiedades aislantes no es posible regenerar la

especie Fe (II), por lo que se observará una disminución de la intensidad de corriente medida en la punta al acercarse al sustrato. Este efecto, en contraposición con el anterior, se denomina retroalimentación negativa (feedback negativo) e implica que al recoger la curva de aproximación se produce un mayor impedimento en la difusión de la especie electroactiva hacia la punta del microscopio y, consecuentemente, una disminución en la corriente registrada en la punta del microscopio.

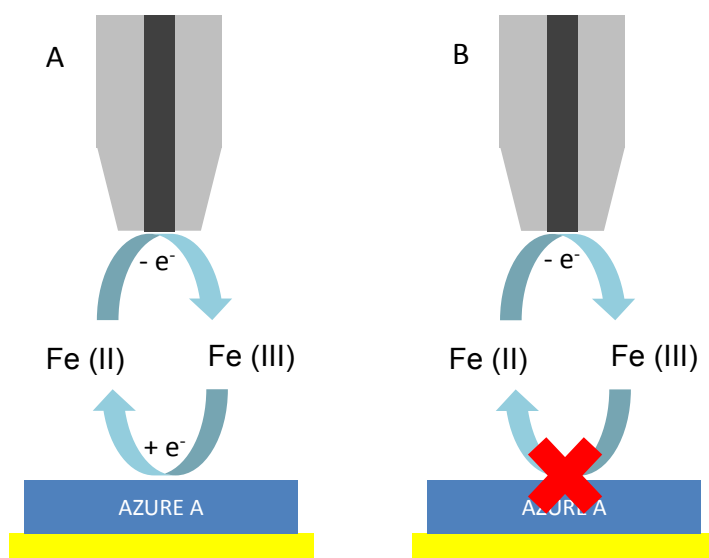


Fig. 57. Esquema de los posibles mecanismos de retroalimentación (feedback) para un electrodo de oro modificado con películas electroinjetadas de Azure A. A) Feedback positivo B) Feedback negativo.

Las curvas de aproximación obtenidas para dos electrodos de oro modificados con Azure A mediante 10 y 100 ciclos de potencial en presencia de ferrocianuro potásico, se muestran en la figura 58. Se observa que cuando el electrodo ha sido modificado mediante 10 ciclos de electroinjerdo la curva de aproximación presenta un feedback positivo, lo que implica que la película electroinjetada

presenta propiedades conductoras respecto a la transferencia electrónica (línea continua). Por el contrario, si el electrodo se ha modificado mediante 100 ciclos de potencial la corriente registrada en la punta al acercarse a la superficie electródica disminuye bruscamente, lo que se corresponde con un comportamiento por feedback negativo (línea discontinua) e implica la existencia de serias limitaciones en la transferencia electrónica a través de la película de Azure A.

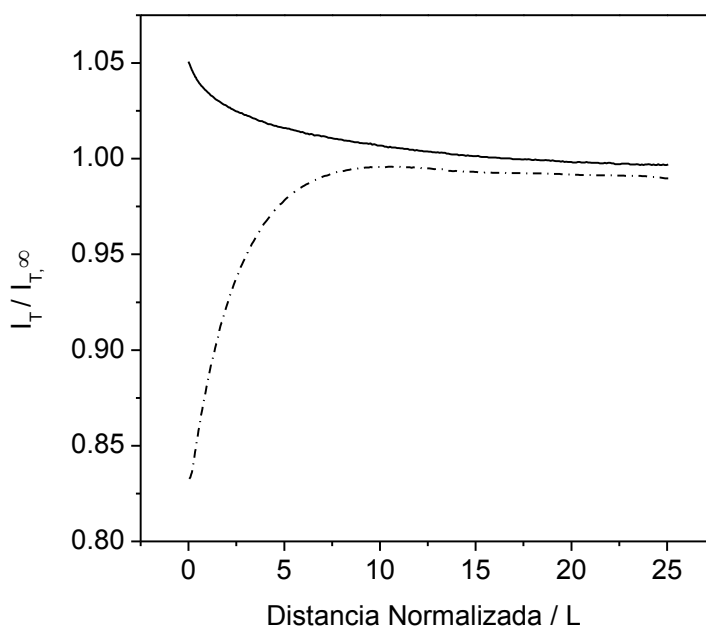


Fig. 58. Curvas de aproximación obtenidas mediante SECM de electrodos de oro modificados con Azure A mediante 10 (línea continua) o 100 (línea discontinua) ciclos de potencial en presencia de una disolución de ferrocianuro potásico 1mM en KCl 0.1 M.

Los resultados obtenidos mediante SECM corroboran la hipótesis planteada en el punto anterior, donde se postulaba que una excesiva acumulación de material en forma de multicapas conllevaba

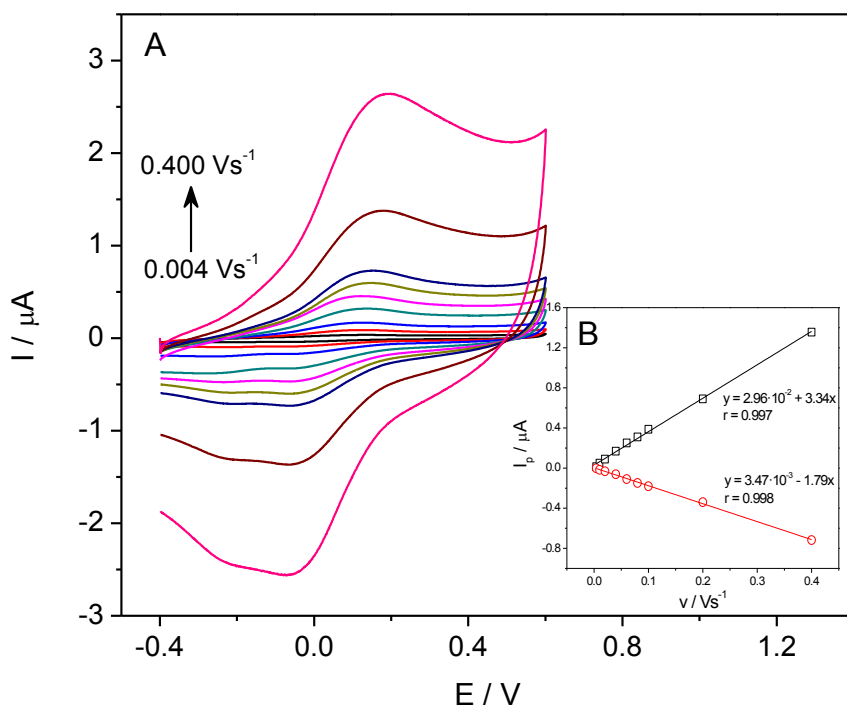
la existencia de mayores dificultades en la transferencia electrónica a través de la película, siendo ésta la causa por la cual no se produce el electroinjerto de nuevas moléculas de Azure A de forma ilimitada.

## 5.2. Cálculo de $K_s$ y $\alpha$ .

Con el objetivo de estudiar el efecto del espesor de la película electroinjerada de Azure A sobre las variables que describen la cinética de transferencia electrónica, se obtuvieron los valores de la constante heterogénea de transferencia de carga ( $K_s$ ) y el coeficiente de transferencia ( $\alpha$ ) para el caso de electrodos modificados mediante 10 y 100 ciclos de electroinjerto de Azure A, según el método descrito por Laviron y recogido en el procedimiento experimental.

Para ello, dos electrodos de oro se modificaron con Azure A aplicando 10 y 100 ciclos de electroinjerto, recogiendo su respuesta ciclovoltamperométrica a velocidades comprendidas entre 0.004 y 0.4  $\text{Vs}^{-1}$  (Fig. 59) y a velocidades comprendidas entre 0.6 y 20  $\text{Vs}^{-1}$  (Fig. 60) en electrolito soporte. En los voltamperogramas que se muestran en la figura 59, se aprecia que para ambos electrodos modificados se produce un desplazamiento en el potencial de pico tanto anódico como catódico al aumentar la velocidad de barrido, lo que sugiere que la transición entre forma oxidada y forma reducida en la película de Azure A es lenta. Este comportamiento se acentúa en el electrodo modificado con 100 ciclos donde, incluso a velocidades de barrido tan bajas como 0.004  $\text{Vs}^{-1}$ , la diferencia entre el potencial de pico anódico y catódico ( $\Delta E_p$ ) presenta un valor muy elevado, de +0.452 V. Este resultado indica que cuando el espesor de la película de Azure A es grande, los electrodos modificados presentan un comportamiento electroquímicamente irreversible.

Por otra parte, en las figuras 59.B y 59.D se muestra que tanto los electrodos modificados con 10 ciclos como los modificados con 100 presentan una relación lineal entre la intensidad de pico y la velocidad de barrido. Dicho comportamiento es característico de especies que se encuentran confinadas en la superficie electródica [150].



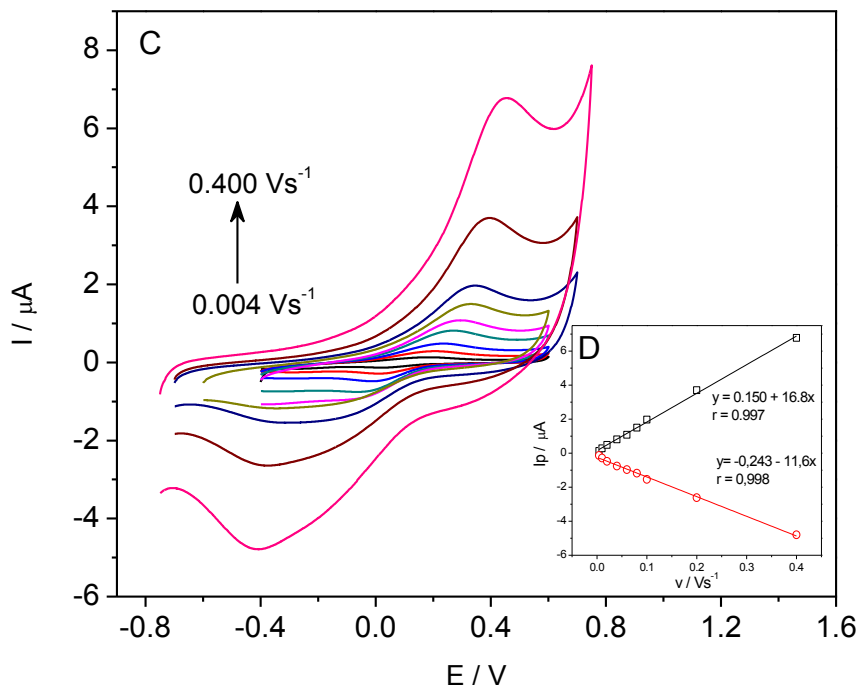
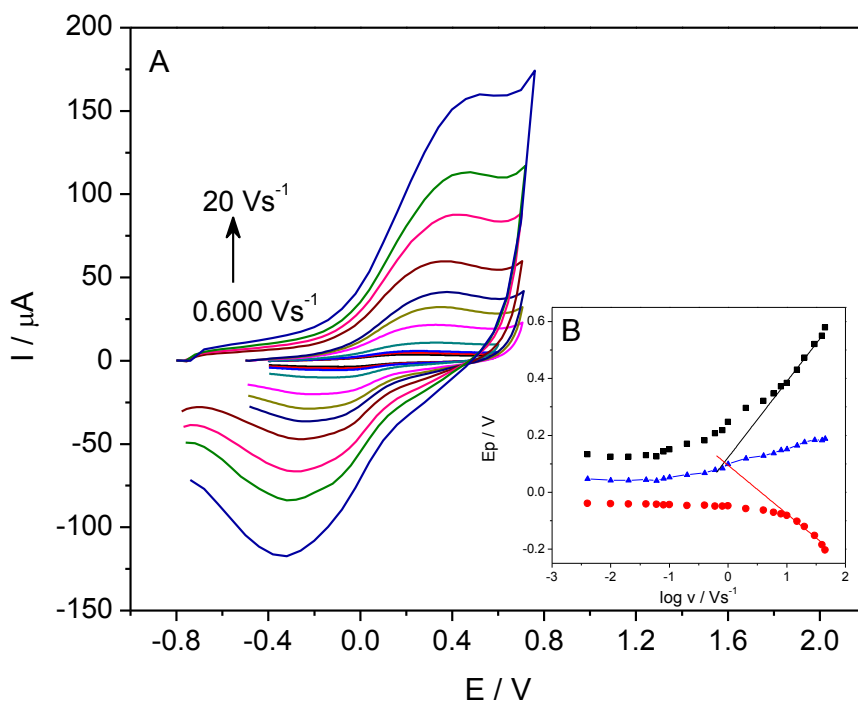


Fig. 59. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro modificado con A) 10 y C) 100 ciclos de potencial de electroinjerto de Azure A (5 mM) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a distintas velocidades de barrido. Inserto B y D: Representación de la intensidad de corriente de pico anódica y catódica en función de la velocidad de barrido en tampón fosfato pH 7 (0.1M) de los electrodos modificados correspondientes.

En la figura 60.A y 60.C se muestra la respuesta voltamperométrica para velocidades de barrido en el intervalo de 0.6 a 20  $\text{Vs}^{-1}$ . Como era de esperar, la separación en los potenciales de pico es mayor al aumentar la velocidad de barrido, evidenciando la existencia de limitaciones de tipo cinético en la transferencia de carga a través de la película de Azure A, incluso cuando esta se genera con tan solo 10 ciclos de potencial. Como se observa en las figuras 60.B y 60.D, a velocidades de barrido superiores a 5  $\text{Vs}^{-1}$  en el electrodo modificado con 10 ciclos de electroinjerto y de 0.8  $\text{Vs}^{-1}$  para el



electrodo modificado con 100 ciclos, el potencial de pico en ambos casos muestra una respuesta lineal frente al logaritmo de la velocidad de barrido. Por tanto es posible aplicar el método descrito por Laviron [131], para calcular la constante heterogénea de transferencia de carga ( $k_s$ ) y el coeficiente de transferencia ( $\alpha$ ) de ambos electrodos.



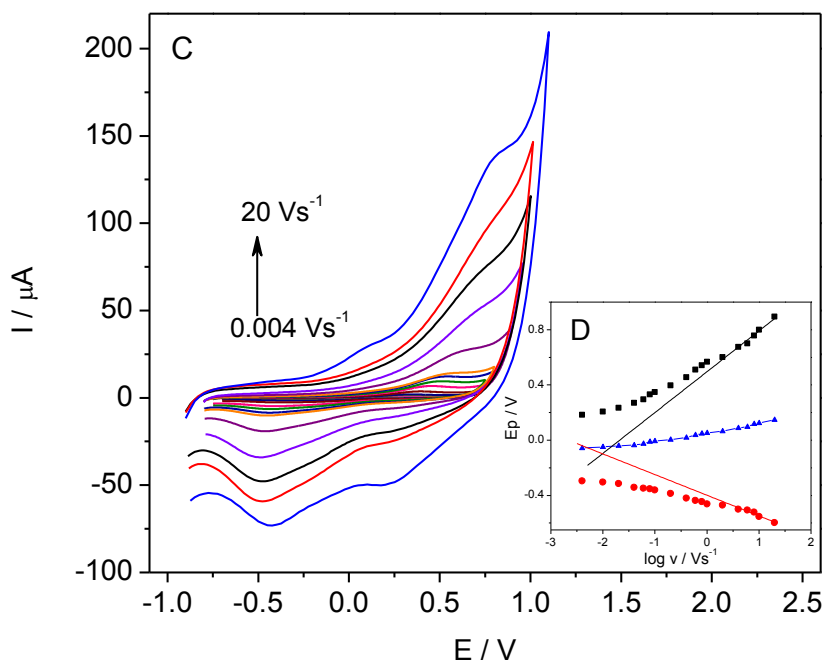


Fig. 60. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro modificado con A) 10 y C) 100 ciclos de electroinjerto de Azure A (5 mM) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a distintas velocidades de barrido. Inserto B y D: Grafica de la dependencia del potencial de pico anódico (cuadrados negros) y catódico (círculos rojos) en función del logaritmo de la velocidad de barrido para los electrodos modificados con 10 y 100 ciclos, respectivamente.

Para películas electroinjeratas con 10 ciclos de potencial se han obtenido unos valores para  $k_s$  y  $\alpha$ , de  $4.0 \text{ s}^{-1}$  y 0.44 respectivamente; mientras que para el caso de 100 ciclos, los valores obtenidos han sido  $0.8 \text{ s}^{-1}$  y 0.74. Los valores obtenidos reflejan que las películas modificadas con 10 ciclos de electroinjerto muestran una moderada transferencia electrónica a través de la película electroactiva. Por el contrario, cuando se ha saturado la superficie electródica, formando películas de gran espesor, la transferencia electrónica a través de ésta es prácticamente nula, y el coeficiente de transferencia se aleja claramente del valor que representa la simetría del sistema electroquímico.

El análisis de los parámetros cinéticos junto con los obtenidos mediante los estudios de SECM, confirman que cuando el electroinjerto de Azure A da lugar a películas de gran espesor, se impide la transferencia electrónica a través de la película, dando lugar a un dramático efecto de bloqueo de la superficie electródica.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible modular el espesor de la película electroinjertada de Azure A y en consecuencia no solo sus propiedades viscoelásticas y cinéticas, sino también electroquímicas en función del número de ciclos de potencial aplicados en la etapa de electroinjerto.

## **6. Electrocatalisis de NADH sobre electrodos de oro modificados mediante electroinjerto de Azure A.**

Como se ha descrito en el capítulo anterior, el propósito último de la modificación de superficies electródicas mediante electroinjerto de Azure A es el desarrollo de sistemas electrocatalíticos para NADH. Con esta finalidad, se estudió el comportamiento de los electrodos modificados obtenidos tras 10 y 100 ciclos de electroinjerto frente a la oxidación catalítica de NADH. Para ello, se estudió su respuesta en ausencia y en presencia de NADH 1 mM a una velocidad de barrido de potencial de 10 mVs<sup>-1</sup>. Como se muestra en la figura 61, el electrodo modificado con 10 ciclos de electroinjerto, presenta un potente efecto electrocatalítico, dado el incremento de la intensidad de pico anódico concomitante con la disminución de la intensidad de pico catódica en presencia de NADH (Fig. 61.B). El pico de oxidación correspondiente al NADH se encuentra al mismo potencial al que aparece el del mediador inmovilizado (Azure A), por tanto se puede afirmar que el proceso electrocatalítico es cinéticamente rápido. Asimismo, se consigue rebajar la sobretensión que conlleva la

oxidación de NADH sobre el electrodo de oro sin modificar (Fig 61.A) en 800 mV. Se comparó esta respuesta con la obtenida cuando se ha llevado a cabo el crecimiento de la película electroactiva con 100 ciclos (Fig 61.B). En este caso, la respuesta catalítica obtenida es más débil.

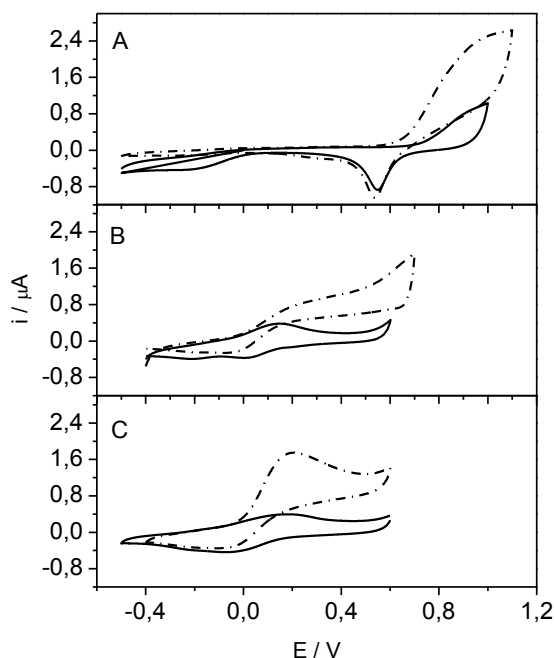


Fig. 61. Voltamperogramas cíclicos del electrodo sin modificar (A) o modificado con Azure A (5mM, 10sc) (B y C) en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a  $10 \text{ mVs}^{-1}$  en ausencia (línea continua) o presencia (línea discontinua) de NADH 1mM. Las gráficas B y C representan la modificación mediante 100 y 10 ciclos de electroinjerto de Azure A, respectivamente.

Como era de esperar, los resultados obtenidos muestran que la formación de películas electroinjertadas de gran espesor supone una disminución en las propiedades electrocatalíticas. La eficiencia catalítica ( $I_{cat}/I_{dif}$ ) para el electrodo modificado con 10 ciclos es de 4.3, mientras que cuando se aplicaron 100 ciclos de potencial la eficiencia catalítica cae hasta 1.8. Estos resultados se explican en

base a los parámetros que describen la transferencia electrónica a través de la película de Azure A obtenidos en el apartado anterior.

Los electrodos de oro modificados con películas delgadas Azure A presentan valores de eficiencia catalítica superiores a los descritos en la literatura para electrodos de oro modificados con fenotiazinas similares como Dibenzoditiodiazapentaceno (DDDP) ( $I_{cat}/I_{dif} \sim 2.6$ ) mediante adsorción [151], ó electrodos de oro modificados con una monocapa de cistamina y posterior modificación con Tionina ( $I_{cat}/I_{dif} \sim 2.4$ ) [77].

Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en este trabajo sobre la eficiencia del procedimiento de electroinjerto en la modificación de electrodos con fenotiazinas utilizados como sistemas catalíticos.

### **6.1. Estudio de la constante catalítica mediante el método de Galus.**

Por último, se ha calculado la constante catalítica del proceso de electroxidación de NADH para los electrodos de oro siguiendo el método descrito por Galus. Para ello, se obtuvieron los correspondientes cronoamperogramas aplicando un pulso de potencial desde -0.6 V, donde no existe proceso faradaico, hasta +0.4 V, donde si lo hay, frente a concentraciones crecientes de NADH en el intervalo de 0 a 250  $\mu\text{M}$ . En la figura 62.A se representa la eficiencia catalítica del sensor de NADH en función de la raíz cuadrada del tiempo. Por otra parte, la consiguiente representación de la eficiencia catalítica normalizada respecto a la raíz cuadrada del tiempo en función de la concentración de NADH, obtenida a partir de los datos obtenidos de la figura 62.A, es una línea recta de cuya pendiente se puede calcular la constante catalítica del proceso (Fig.

62.B). Se obtuvo un valor de la constante catalítica para la oxidación de NADH sobre electrodos de oro de  $3.9 \pm 0.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ .

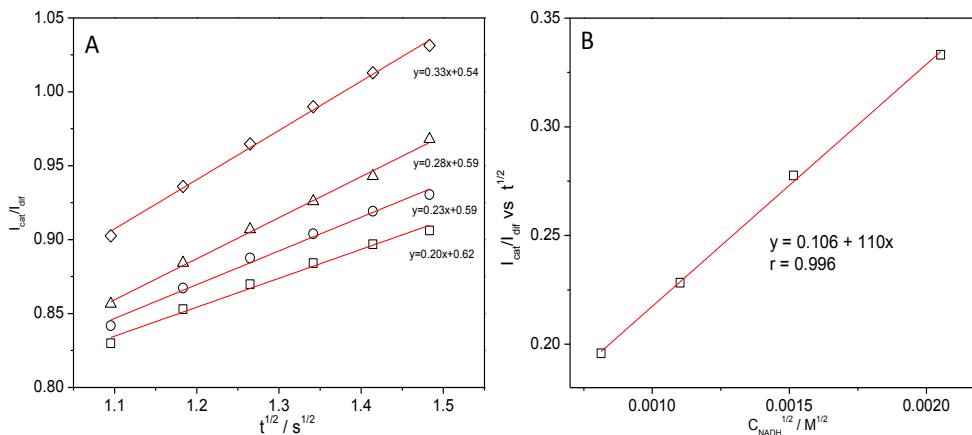


Fig. 62.A) Representación de la eficiencia catalítica respecto a la raíz cuadrada del tiempo de muestreo. Fig. 43.B) Eficiencia catalítica normalizada con la raíz cuadrada del tiempo de muestreo respecto a la raíz de la concentración de NADH para los electrodos de oro.

El valor de la constante es superior al descrito para el caso de otros mediadores redox como los derivados dihidroxisalofen (DHS) sobre electrodos serigrafados de oro modificados con nanotubos de carbono ( $1.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) [152], pero inferior al obtenido sobre electrodos serigrafados de carbono ( $7.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) descrito en el capítulo anterior.

Estos resultados indican que pese a obtener una buena eficiencia catalítica, el electroinjerto sobre electrodos metálicos de oro no es tan eficiente como sobre electrodos serigrafados de carbono.

## 6.2. Sensor de NADH: Propiedades analíticas.

Por último, se han evaluado las propiedades analíticas del sensor desarrollado. Para ello, se obtuvieron las curvas de calibrado mediante cronoamperometría de un pulso de potencial desde un potencial en el que no existía corriente faradaica (-0.3 V) hasta un potencial donde la reacción electroquímica había finalizado (+0.6 V). Se utilizaron los electrodos modificados con Azure A que presentaban mejores características de transferencia electrónica, es decir los preparados mediante 10 ciclos de potencial, y concentraciones crecientes de NADH. La medida de la corriente se registró en estado estacionario y el estudio se realizó con tres electrodos diferentes modificados bajo las mismas condiciones. En la figura 63.A se muestran los cronoamperogramas obtenidos para concentraciones de NADH hasta 503  $\mu\text{M}$ . En la figura 63.B se representa el promedio de la intensidad de corriente, normalizada con el recubrimiento, en función de la concentración de NADH dentro de un intervalo de concentraciones de 0.63 a 4.21  $\mu\text{M}$ .

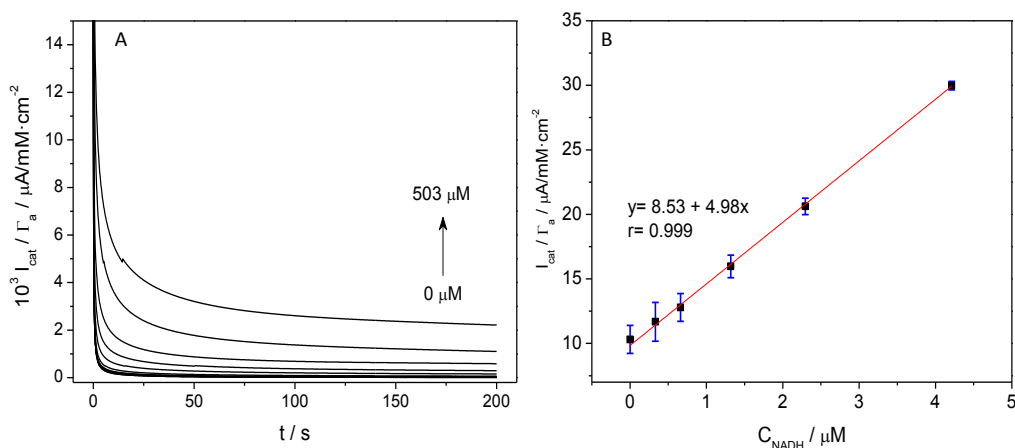


Fig. 63.A) Cronoamperogramas de la oxidación electroquímica de NADH sobre electrodos de oro modificados con Azure A. Fig. 63.B) Curva de calibrado promedio ( $n=3$ ) de la oxidación electroquímica de NADH sobre electrodos de oro modificados con Azure A.

El límite de detección y determinación obtenidos de la parte lineal de la curva de calibrado fueron  $0.57 \pm 0.05 \mu\text{M}$  y  $1.72 \pm 0.09 \mu\text{M}$ , respectivamente. Ambos límites son similares a los obtenidos sobre electrodos serigrafados de carbono modificados con Azure A descritos en el capítulo anterior. La reproducibilidad del método se evaluó comparando la respuesta de tres electrodos para una concentración de NADH igual a  $2.30 \mu\text{M}$ . El valor de la desviación estándar relativa (RSD) obtenido de 7.3 %, es inferior al coeficiente de variación de Horwitz ( $CV_H$ ) que para la concentración utilizada es de 14, lo cual es indicativo de la estabilidad de la respuesta analítica. Asimismo, el dispositivo sensor presenta un amplio intervalo de respuesta lineal.

En la tabla 5 se resumen los parámetros analíticos obtenidos para el sensor descrito, y para otros sensores de NADH descritos en la literatura, basados en electrodos de oro modificados con fenazinas (Rojo neutro) y fenotiazinas (Tionina) similares al Azure A. Así por ejemplo, Mugurama y Hoshino desarrollaron un electrodo de oro modificado mediante polimerización de acetonitrilo por plasma sobre el que se dispone una película adsorbida de Rojo Neutro y nanotubos de carbono [153], como se muestra en la tabla 5, el límite de detección alcanzado es mil veces superior que el logrado con electrodos de oro modificados con Azure A. Por otra parte, tras comparar los datos obtenidos con los obtenidos por Dong y colaboradores [154] utilizando un electrodo de óxido de indio y estaño (ITO) modificado con nanotubos de carbono adsorbidos con Tionina y nanopartículas de oro, o por Gupta y Tiwari [155] donde sobre un electrodo de carbono depositaron nanotubos de carbono modificados con Rojo Neutro y nanopartículas de oro. Puede observarse que el límite de detección obtenido en el presente trabajo es de los más bajos reportados y del mismo orden de magnitud que cuando se utilizan nanopartículas de oro en la construcción del



sensor, cuyas propiedades fisicoquímicas las dotan de una mayor capacidad electrocatalítica.

Tabla 5. Parámetros analíticos de electrodos basados en la utilización de oro como sensores de NADH.

	<i>Sensibilidad</i> ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	<i>Intervalo lineal</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Reproducibilidad</i> (RSD %)	<i>Límite de detección</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Ref</i>
<i>CNT/NR/PPF/Au</i>	3.9	97 - 1200	—	100	[144]
<i>MWCNT/TN/AuNPs/ITO</i>	17	0.5 - 240	4.1	0.1	[145]
<i>AuNPs/NR/CNT/GC</i>	0.59	18 - 1400	4	0.5	[146]
<i>AA/Au</i>	4.98	0.66 - 508	7.3	0.57	<i>Este trabajo</i>

Abreviaturas: PPF (Film pirolizado fotoresistente), CNT (Nanotubos de carbono), NR (Rojo neutro), TN (Tionina), ITO (Óxido de Indio-Estaño).

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten concluir que en primer lugar, se ha podido llevar a cabo de modo satisfactorio el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre superficies metálicas de oro, pese a que la formación de enlaces tipo Au-C no está termodinámicamente favorecida comparada con la formación de enlaces tipo C-C. Además, ha sido posible diseñar un dispositivo electródico donde mediante la optimización de las condiciones de la etapa de electroinjerto se pueden modular las propiedades de la película de Azure A resultante en términos de espesor, viscoelasticidad, transferencia electrónica y capacidad catalítica. Asimismo, los parámetros analíticos del sensor de NADH desarrollado demuestran que puede ser utilizado en la determinación cuantitativa de NADH.



# CAPÍTULO V

---

**ELECTROINJERTO SOBRE ELECTRODOS  
HÍBRIDOS GRAFENO OXIDADO - ORO**



## **1. Electroinjerto sobre electrodos híbridos grafeno oxidado-oro.**

Siguiendo la línea de trabajo desarrollada en capítulos anteriores y con objeto de avanzar en la metodología de diazotación *in situ* y posterior electroinjerto de Azure A sobre superficies electrónicas, se pretende extender esta metodología a nuevos nanomateriales, de gran interés en la actualidad, como el grafeno. Este nanomaterial posee excelentes propiedades mecánicas, electrónicas y ópticas asociadas a su estructura.

El grafeno oxidado se define, como un nanomaterial compuesto esencialmente por una lámina de grafito. En la actualidad dicha denominación engloba un espesor de hasta 5 láminas, debido a la similitud en sus propiedades. Su estructura presenta una amplia variedad de funcionalidades donde interviene el átomo de oxígeno tales como epóxidos, alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos, de modo que los átomos de carbono que sustentan dichas funcionalidades poseen una hibridación entre  $sp^2$  característica del grafeno reducido (o prístino) y  $sp^3$ .

Pese a que tradicionalmente el grafeno oxidado se ha utilizado casi exclusivamente para la síntesis de grafeno reducido, hoy en día, gracias a sus propiedades intrínsecas como su elevada relación superficie-volumen, su hidrofiliidad y una reactividad química muy superior a la del grafeno reducido, está siendo positivamente valorado por la comunidad científica por sus posibles aplicaciones en campos como la nanotecnología, la ciencia de materiales ó la biotecnología y biomedicina mediante el desarrollo de sensores y biosensores. Una de las principales ventajas que conlleva la presencia de grupos funcionales en la estructura del grafeno, es que facilita la modificación superficial mediante interacciones bien covalentes bien

no covalentes con compuestos capaces de introducir nuevas funcionalidades de interés, tales como moléculas con propiedades ópticas o eléctricas, nanopartículas, enzimas, DNA, etc [156].

La funcionalización de grafeno mediante la química de las sales de diazonio fue descrita en 2008 por Tour y colaboradores [50]. Por primera vez lograron la incorporación de varias sales de diazonio en la estructura del grafeno mediante reacción química mediada por la presencia de surfactantes. No obstante, aun tendrían que transcurrir tres años para que viera la luz el primer trabajo donde se recogía la funcionalización de grafeno oxidado mediante la reacción de diazotación de una sal de diazonio [157]. Sin embargo, el primer trabajo en el que se realiza el electroinjerto de una sal de diazonio sobre la estructura del grafeno mediante el uso de técnicas electroquímicas es el desarrollado por X. Guo en 2012 [158].

Como se ha descrito anteriormente, dado que el Azure A es una molécula aromática puede interactuar con otros compuestos que presenten electrones  $\pi$ , a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$  (ó de stacking). Adicionalmente, la diazotación de la molécula de Azure A posibilita bien la interacción por medio del grupo diazo gracias a una interacción electrostática, o bien en caso que el material con el que interactúa tenga suficiente poder reductor cabe la posibilidad de generar un enlace covalente mediante la reducción espontánea del grupo diazo, como por ejemplo ocurre con el grafeno [101].

### 1.1. Caracterización de la interacción entre Azure A y Grafeno oxidado mediante métodos espectrofotométricos.

Con objeto de estudiar la interacción entre la fenotiazina utilizada y el nanomaterial se llevó a cabo el estudio espectrofotométrico. En primer lugar se obtuvo el espectro UV-visible de la disolución acuosa del grafeno oxidado. Como se muestra en la figura 64, se observa una banda de absorción muy intensa a 233 nm que se corresponde con la transición  $n-n^*$  del enlace  $C=C$ , también se observa una banda a 296 nm, debido a la transición  $n-n^*$  del enlace  $C=O$ . Dichas bandas de absorción observadas son características de disoluciones acuosas de grafeno oxidado [159].

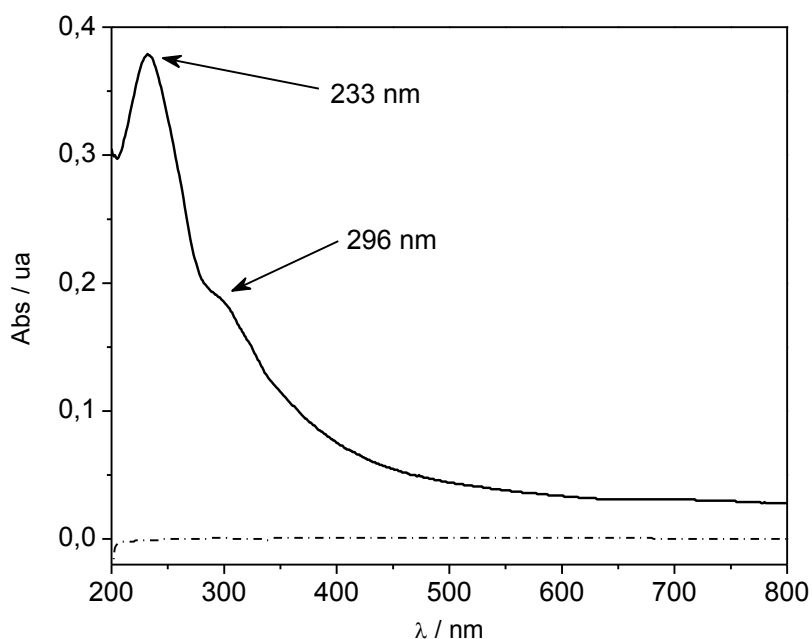


Fig. 64. Espectro UV-Vis de una disolución de grafeno oxidado 0.1 mg/ml en agua destilada (línea continua). En línea discontinua se representa el espectro del blanco utilizado como control.

El Azure A, por su parte, puede presentar varios modos de interacción en función de si ha sufrido reacción de diazotación previa de los grupos amina primaria del anillo aromático o no. De modo que se llevó a cabo el estudio espectrofotométrico de la interacción de grafeno oxidado y Azure A, en presencia y en ausencia de diazotación previa. En las figuras 65.A y 65.B se recogen los espectros UV-vis correspondientes a las disoluciones de Azure A sin diazotación y diazotadas, respectivamente, en ausencia (línea roja) y en presencia (línea negra) de cantidades crecientes de grafeno oxidado. En ausencia de diazotación (Fig 65.A) la disolución de Azure A presenta un color azul intenso observándose un máximo de absorción a 630 nm, así como una serie de bandas en la región 200 a 350 nm que se corresponden con transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  y  $n\text{-}\pi^*$  de los anillos aromáticos. El espectro correspondiente al Azure A diazotado (Fig 65.B) muestra una mayor complejidad que el recogido en ausencia de diazotación. En ambas situaciones, diazotación y no diazotación, se observa una variación en el patrón de las bandas correspondientes a transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$  y  $n\text{-}\pi^*$  respecto a las observadas para el grafeno oxidado (Fig. 64), causadas por la existencia de interacciones tipo  $\pi$  entre el Azure A y el grafeno oxidado. Por otra parte, la diazotación del Azure A provoca un desdoblamiento de la banda de absorción a 630 nm del espectro anterior, sufriendo simultáneamente un desplazamiento batocrómico a 649 nm y un desplazamiento hipsocrómico a 613 nm. El efecto batocrómico, o desplazamiento hacia el rojo, puede estar causado por la extensión de la conjugación electrónica provocada por la formación del grupo diazo sobre el anillo aromático [160]. El espectro muestra además una banda a 450 nm, que se asigna al grupo diazo generado mediante la reacción de la amina aromática primaria con nitrito sódico.



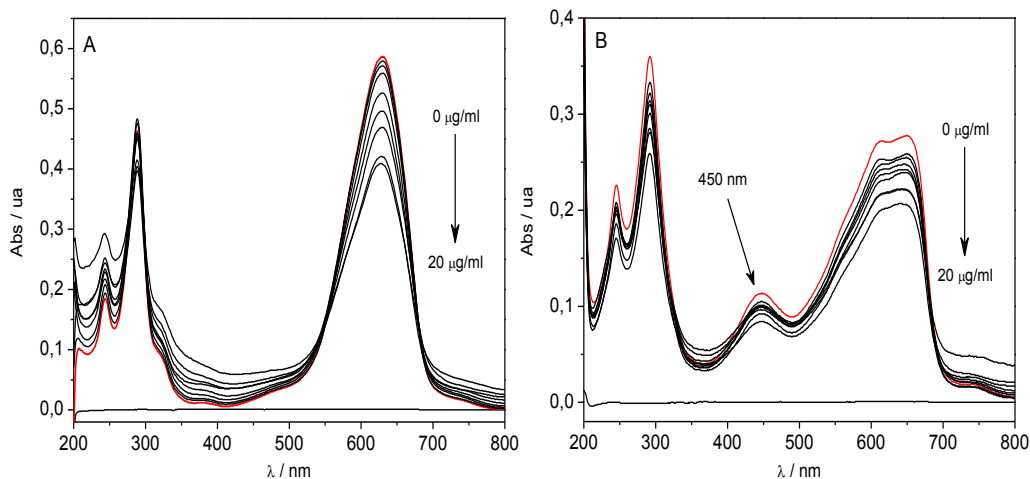


Fig. 65.A) Titulación espectrofotométrica de una disolución de Azure A sin diazotar ( ) con grafeno oxidado (0-20  $\mu\text{g/ml}$ ). En línea roja se representa el espectro del Azure A sin diazotar en ausencia de grafeno oxidado. Fig. 65.B) Titulación espectrofotométrica de una disolución de Azure A diazotado (13  $\mu\text{M}$ ) con grafeno oxidado (0-20  $\mu\text{g/ml}$ ). En línea roja se muestra el espectro del Azure A diazotado en ausencia de grafeno oxidado.

Los espectros de absorción obtenidos para el Azure A, diazotado o no, en presencia de concentraciones crecientes de grafeno oxidado (línea negra) muestran un claro efecto hipocrómico en la banda de absorción situada en el visible, a medida que aumenta la concentración de grafeno en la disolución. Una de las explicaciones más plausibles a este fenómeno se debe a que el llenado electrónico parcial de los niveles energéticos del Azure A, promueve una mayor interacción entre los orbitales  $\pi$  del Azure A con los orbitales  $\pi$  del grafeno oxidado, lo que provoca una disminución en las probabilidades de transición y consecuentemente una disminución en la intensidad de absorción. Por otra parte, la banda de absorción a 450 nm correspondiente al grupo diazo (Fig. 65.B) no desaparece al añadir grafeno oxidado, por tanto suponemos que el Azure A diazotado interacciona fundamentalmente a través de la nube de electrones  $\pi$  (interacción  $\pi$ - $\pi$ ). La presencia de este grupo en el

espectro, indica que el grafeno oxidado no posee suficiente poder reductor para provocar el electroinjerto de Azure A sobre el nanomaterial de manera espontánea; contrariamente a lo descrito en la bibliografía para el grafeno reducido, donde en ciertos casos es posible el electroinjerto espontáneo de una sal de diazonio [101].

El escaso poder reductor del grafeno oxidado se puede explicar por la presencia de grupos funcionales oxigenados que al romper la estructura  $sp^2$  del grafeno provocan tanto la existencia del fenómeno de localización de Anderson que implica el confinamiento electrónico en los defectos del material, como la ausencia de solapamiento entre la banda de conducción y de valencia, que tiene como consecuencia una disminución significativa en la movilidad electrónica de los portadores de carga [94].

Los estudios mediante espectrofotometría UV-Vis, confirmaron que existe una interacción entre la molécula de Azure A y el grafeno. Con el objetivo de comprobar si esta interacción puede derivar en una modificación del nanomaterial con la fenotiazina, se realizaron los espectros FT-IR de los precipitados obtenidos al centrifugar las disoluciones utilizadas en los estudios espectrofotométricos. Igualmente se obtuvo el espectro del precipitado obtenido tras centrifugar la disolución de grafeno oxidado utilizado como control. En la figura 47 se observan los espectros de transmisión FT-IR de los respectivos precipitados. La figura 66.A muestra las bandas características del grafeno oxidado, a  $3430\text{ cm}^{-1}$  aparece un pico ancho correspondiente a la vibración de tensión O-H, los picos a  $2930$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  se asignan a la frecuencia de vibración asimétrica y simétrica del enlace C-H, a  $1725\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda poco intensa, pero característica de la tensión C=O, mientras que el pico agudo e intenso que aparece a  $1625\text{ cm}^{-1}$  se asigna a la tensión C=C, el doblete a  $1390$  y  $1320$  puede ser debido a la vibración de tensión C-O, por último el pico observado a

1067 se asocia a la tensión C-O-C. Como es de suponer, los picos observados en el espectro del grafeno oxidado serán comunes a los tres espectros. La similitud en los picos de los espectros 66.B y 66.C hace imposible la diferenciación entre el Azure A diazotado y no diazotado, los picos aparecen a frecuencias muy próximas, cuando no coincidentes, por lo que se asumirá que se deben a las vibraciones de los mismos grupos funcionales. En los espectros aparecen un par de picos a  $\sim 2965$  y  $2880\text{ cm}^{-1}$  que se asignan a la vibración asimétrica y simétrica del grupo N-metilo, el pico observado a  $1473$  se corresponde con la flexión asimétrica del grupo N-metilo, por último el pico que presenta una mayor intensidad, a  $1120\text{ cm}^{-1}$ , se adscribe a la flexión fuera del plano del mismo grupo [161].

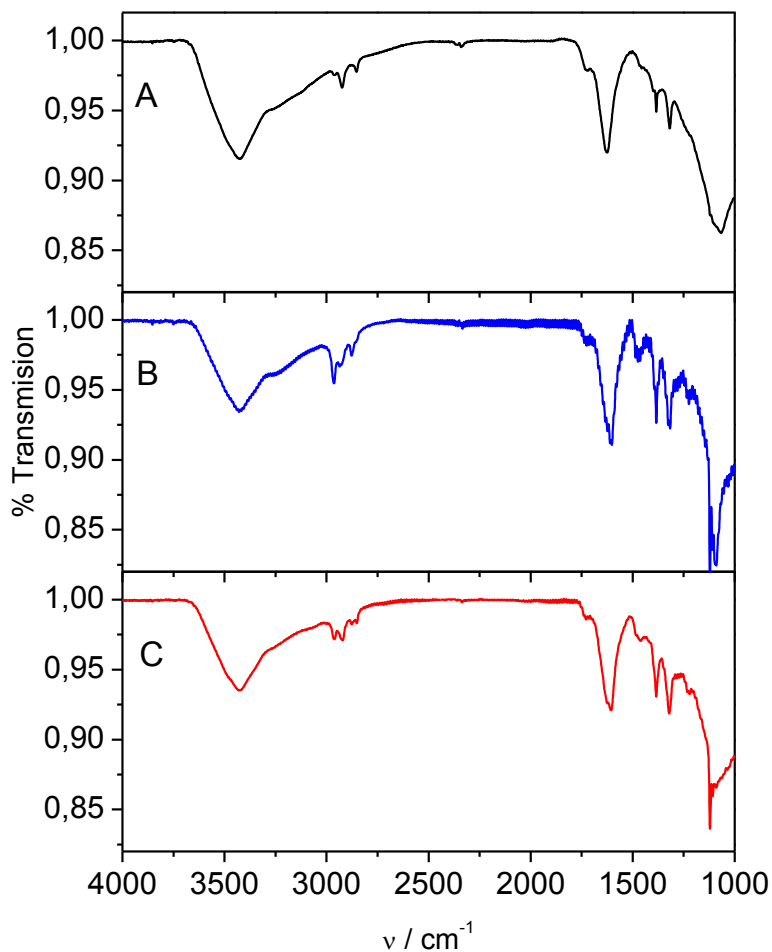


Fig. 66.A) Espectro IR del grafeno oxidado sintetizado por el grupo. Fig. 66.B) y C) Espectros IR de los precipitados obtenidos tras llevar a cabo la titulación espectrofotométrica para condiciones de Azure A sin diazotar y diazotado, respectivamente.

Los espectros FTIR obtenidos no han permitido la identificación de los picos característicos del Azure A de forma satisfactoria y confirmar así la unión de la fenotiazina al grafeno. Pese a que se observan indicios de la presencia de Azure A, como las bandas correspondientes a vibraciones del grupo amina secundaria,

no se aprecian más bandas características. Esto puede ser debido a que la existencia de un mayor porcentaje de grafeno oxidado en el precipitado enmascare los picos debidos al Azure A.

Con el fin de validar los resultados obtenidos anteriormente, y averiguar si la fenotiazina se encuentra unida al grafeno oxidado, los precipitados que contienen grafeno oxidado (control) y grafeno oxidado con Azure A diazotado se resuspendieron en la mínima cantidad de acetona y se dispusieron sobre la superficie de un electrodo de oro, registrándose su imagen voltamperométrica en tampón fosfato pH 7 (0.1M) previamente desaireado (Fig. 67). Los electrodos modificados con el precipitado de grafeno oxidado (línea discontinua) o con grafeno oxidado y Azure A diazotado (línea continua), muestran una gran corriente capacitiva y no se aprecia el par redox correspondiente al Azure A, que debería aparecer en el intervalo de potencial de -0.1 a +0.2 V.

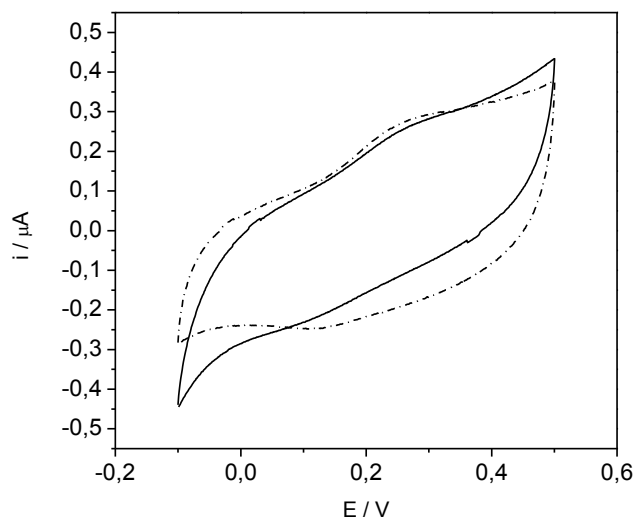


Fig. 67. Voltamperogramas cíclicos de los electrodos serigrafados de oro modificados con el precipitado obtenido tras la centrifugación de la disolución de grafeno oxidado (línea discontinua) y del precipitado obtenido tras llevar a cabo la titulación espectrofotométrica de la disolución de Azure A diazotado con grafeno oxidado (línea continua).

Los resultados obtenidos indican que, aunque a la vista de los estudios mediante espectrofotometría UV-Vis el grafeno oxidado interacciona con el Azure A, no ha sido posible demostrar de forma clara que esta interacción da lugar a la modificación del nanomaterial.

## **2. Diseño y fabricación un electrodo híbrido grafeno oxidado-oro.**

Existen multitud de metodologías que permiten incorporar nuevos nanomateriales a la superficie electródica de diferentes materiales, con el fin mejorar sus propiedades intrínsecas o bien dotarlos de nuevas y mejoradas características. Las principales estrategias de modificación de electrodos con grafeno oxidado se basan en la modificación física como la adsorción, recubrimiento por rotación (ó spin-coating) o bien en el atrapamiento con polímeros o sobre matrices inorgánicas. A comienzos de esta década se empezó a utilizar la metodología de las monocapas autoensambladas para la incorporación de grafeno a superficies electródicas. En particular Shao-Yu y colaboradores, llevaron la modificación de un electrodo de disco de oro con láminas de grafeno a través de su interacción electrostática con una monocapa autoensamblada de octadecanotiol [162]. En base a este trabajo, en el presente trabajo se optó por utilizar la química de las monocapas autoensambladas (SAMs) para la modificación de superficies electródicas de oro con grafeno oxidado a fin de diseñar un dispositivo que aúne tanto la contribución del nanomaterial como de la superficie metálica de oro.

Para ello se ha seguido una estrategia de modificación basada en la utilización de un tiol funcionalizado en su posición terminal como punto de anclaje para incorporar el nanomaterial en la superficie electródica, mediante la formación de un enlace covalente entre los

grupos funcionales presentes en el grafeno oxidado y el grupo funcional de la monocapa autoensamblada que modifica la superficie del electrodo de oro. El tiol funcionalizado utilizado fue la cistamina, un tiol de cadena corta que posee una amina en posición terminal y que, mediante la activación con carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), reacciona con los ácidos carboxílicos presentes en el grafeno oxidado para formar un enlace tipo amida. De este modo, y tal como se detalla en el apartado de materiales y métodos, el grafeno oxidado queda enlazado covalentemente a la superficie del electrodo, de acuerdo con el esquema de la figura 68.

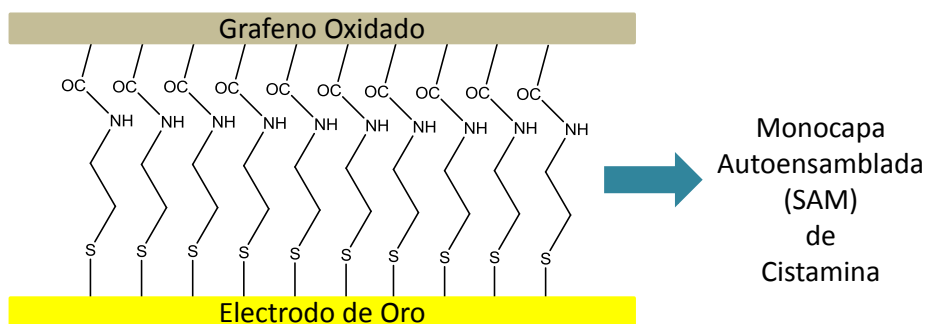


Fig. 68. Esquema de la modificación de superficies metálicas de oro con grafeno oxidado mediante la utilización de una SAM de cistamina.

### **2.1. Estudio de la incorporación de grafeno oxidado mediante Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).**

La eficacia del proceso de inmovilización del grafeno oxidado sobre la superficie de oro recubierta con cistamina mediante la reacción de entrecruzamiento con EDC y NHS, se evaluó utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Esta técnica permitió cuantificar la cantidad de material inmovilizado, monitorizando la

variación de la frecuencia de resonancia del oscilador de cuarzo en cada una de las etapas seguidas en la inmovilización del grafeno.

En primer lugar, como se muestra en la figura 69.A se llevó a cabo un experimento control donde se registró la variación de la frecuencia de un resonador de cuarzo sobre el que se ha depositado grafeno oxidado, en ausencia de la monocapa de cistamina y de los agentes de entrecruzamiento EDC y NHS. A continuación se obtuvo la respuesta piezoeléctrica del cristal recubierto con cistamina y grafeno en ausencia de los agentes EDC y NHS (Fig. 69.B). Por último, se llevó a cabo el procedimiento de entrecruzamiento del grafeno oxidado con EDC/NHS sobre el electrodo de oro modificado con cistamina, como se muestra en la figura 69.C. Cuando el grafeno oxidado se ha enlazado covalentemente a la monocapa de cistamina mediante la reacción de entrecruzamiento se aprecia una disminución de 51 Hz en la frecuencia de resonancia del cristal, que según cálculos realizados utilizando la ecuación de Sauerbrey se corresponde con un recubrimiento de  $885 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Fig 69.C). Sin embargo, cuando se modifica la superficie del cristal bien mediante adsorción directa del grafeno (Fig 69.A) o bien mediante adsorción inespecífica sobre la cistamina (Fig 69.B) la disminución es de 12 y 17 Hz, valores que se corresponderían a recubrimientos de 212 y 301  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectivamente.



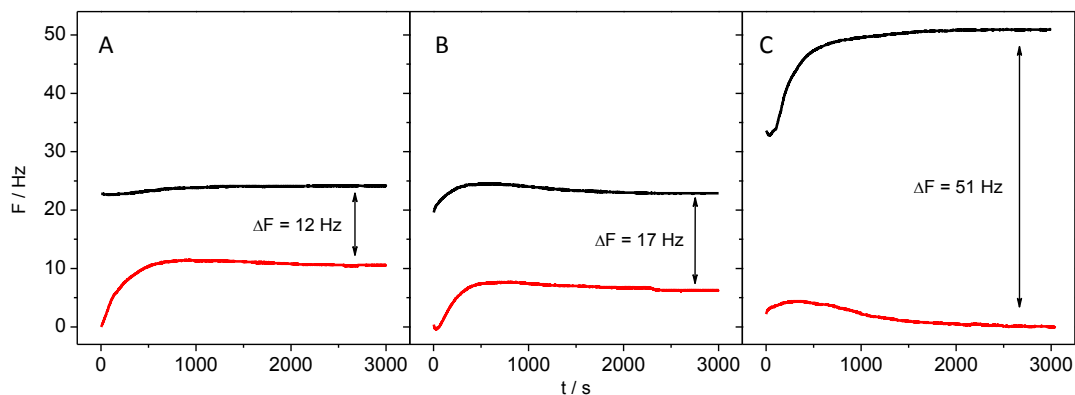


Fig. 69. Variación de la frecuencia de resonancia en función del tiempo de un cristal de microbalanza sin modificar (línea roja) y modificado (línea negra) con (A) grafeno oxidado (0.1 mg/ml) (B) cistamina 1mM y grafeno oxidado (0.1 mg/ml) en ausencia de reacción de acoplamiento y (C) cistamina 1mM y grafeno oxidado (0.1 mg/ml) tras llevar a cabo la reacción de acoplamiento con EDC/NHS (1mM).

Los valores de recubrimiento calculados han sido obtenidos tras aclarar con agua destilada la superficie del resonador de cuarzo. Los datos experimentales muestran que el recubrimiento superficial obtenido cuando se realiza el procedimiento de entrecruzamiento con EDC/NHS es muy superior al obtenido en ausencia de este. Por tanto, la formación de un enlace de tipo covalente entre los grupos ácido carboxílico presentes en el grafeno oxidado y los grupos amina de la monocapa de cistamina implica una mayor estabilidad del depósito de grafeno oxidado, así como un mayor recubrimiento. En ausencia de agentes de entrecruzamiento, se obtiene un recubrimiento similar tanto si el grafeno oxidado se deposita sobre la monocapa de cistamina o sobre la superficie de oro, las pequeñas diferencias pueden estar causadas por fenómenos de interacción electrostática entre cistamina y grafeno oxidado.

En conclusión, realizar el procedimiento de entrecruzamiento con EDC/NHS generando un enlace covalente entre grafeno oxidado y cistamina, conduce a dispositivos que presentan mayor recubrimiento de grafeno oxidado y a una unión del nanomaterial más estable.

Con el fin de confirmar la presencia y la naturaleza del material depositado, así como para estudiar la estructura y propiedades del electrodo híbrido desarrollado, se llevó a cabo una exhaustiva caracterización. Para ello se utilizaron técnicas de caracterización de superficies tales como la microscopía electrónica de barrido (SEM), Raman o de fuerza atómica (AFM)

## **2.2. Caracterización del electrodo híbrido grafeno oxidado-oro mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).**

La microscopía electrónica de barrido permite estudiar la morfología, distribución y composición de las láminas de grafeno oxidado depositadas sobre la superficie de oro mediante la detección de los electrones reflejados por la muestra, bien sean primarios o secundarios, así como la emisión de radiación electromagnética. En la figura 70.A se muestra la imagen correspondiente a una placa de oro sin modificar, en ella se pueden apreciar los diferentes dominios estructurales del oro. Cuando la placa se ha modificado con cistamina (Fig. 70.B) los dominios cristalográficos del oro no se aprecian con tanta nitidez y se observa una especie de recubrimiento sobre la superficie de la placa, dado que la cistamina es un tiol de cadena corta no es posible diferenciar su estructura mediante SEM. Por último en la imagen 70.C se aprecia que tras la incorporación del grafeno oxidado mediante la reacción de acoplamiento existe una

zona mucho más oscura caracterizada por la presencia de pliegues, que confirma la incorporación de grafeno oxidado sobre la superficie de la placa de oro modificada con cistamina.

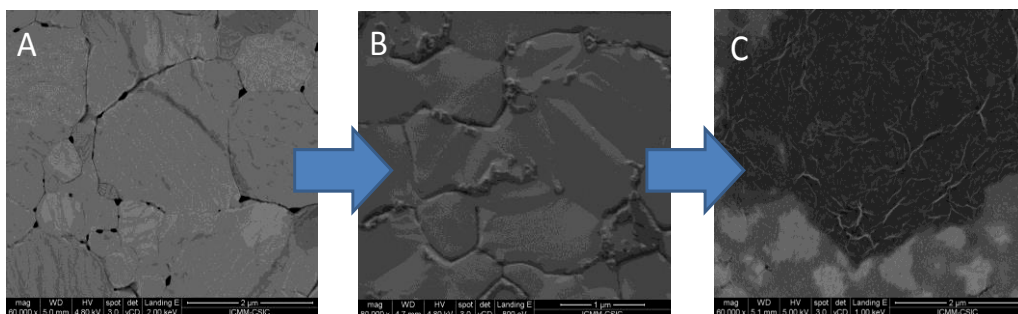


Fig. 70.A) Imagen SEM de la superficie de una placa de oro previamente acondicionada. Fig. 70.B) Imagen SEM de una placa de oro modificada con cistamina. Fig. 70.C) Imagen de la superficie de oro modificada con cistamina tras realizar el acoplamiento de grafeno oxidado mediante EDC/NHS.

En la figura 70.C, se puede observar un gran recubrimiento de grafeno que alcanza aproximadamente al 60% de la superficie observada. Por consiguiente, los resultados obtenidos permiten confirmar que el método de modificación empleado es apropiado para incorporar este nanomaterial sobre la superficie metálica de oro.

Pese a que la microscopía SEM es una técnica muy útil para la caracterización morfológica de superficies modificadas no es la técnica más adecuada para analizar otras características derivadas de la modificación; como por ejemplo, el espesor del material depositado, debido a su baja resolución en el eje z. Por este motivo, se utilizaron diversas técnicas que permiten estimar el espesor de la

capa modificadora como por ejemplo la microscopia de fuerza atómica (AFM) o la elipsometría

### **2.3. Caracterización mediante microscopia de fuerza atómica (AFM).**

Desde el descubrimiento del grafeno por Geim y Novoselov en 2004 [163], la microscopia de fuerza atómica (AFM) ha sido la técnica de análisis superficial más empleada para evaluar el número de láminas de grafeno depositadas sobre una muestra. La principal restricción que presenta la microscopia de fuerza atómica (AFM) reside en su carácter local, dado que su área de acción se circunscribe al escaneo de áreas de muestra muy pequeñas, siendo el área de estudio máxima de aproximadamente,  $150 \times 150 \mu\text{m}$ . Este hecho, junto a una velocidad de barrido lenta hace que pese a su extraordinaria resolución espacial, la AFM se haya utilizado principalmente como técnica complementaria en el análisis y caracterización de ciertos nanomateriales, como por ejemplo el grafeno.

Con el fin de estudiar el espesor de la película resultante y la disposición de los depósitos de grafeno oxidado sobre la superficie de oro modificada se llevaron a cabo medidas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). En la figura 71 se muestran las imágenes de AFM de dos placas de oro modificadas con grafeno oxidado, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La figura 71.A muestra la imagen correspondiente a un área de  $600 \times 600 \text{ nm}$ , en ella se aprecia un único depósito de grafeno oxidado de gran extensión, cuya distancia longitudinal y transversal máxima es de 593 y 384 nm, respectivamente. Con objeto de evaluar el espesor de este depósito se han calculado los correspondientes perfiles de altura en tres

puntos diferentes del depósito de grafeno, líneas roja, azul y negra, mediante el software Gwyddion (Fig 71.C), obteniéndose un espesor promedio de  $3.6 \pm 0.5$  nm. En la figura 71.B, se muestra un área más amplia de la placa de oro, de  $1.3 \times 1.3 \mu\text{m}$ , en ésta se puede observar que el grafeno recubre buena parte de la placa de oro, apreciándose la acumulación de varios depósitos de grafeno oxidado de tamaño similar al observado en la figura 71.A. Con fines comparativos se ha calculado el perfil de altura para varios depósitos diferentes de grafeno oxidado, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior. En este caso el perfil de altura se muestra en la figura 71.D y el valor del espesor promedio para estos tres depósitos de grafeno oxidado es de  $4.4 \pm 0.8$  nm.

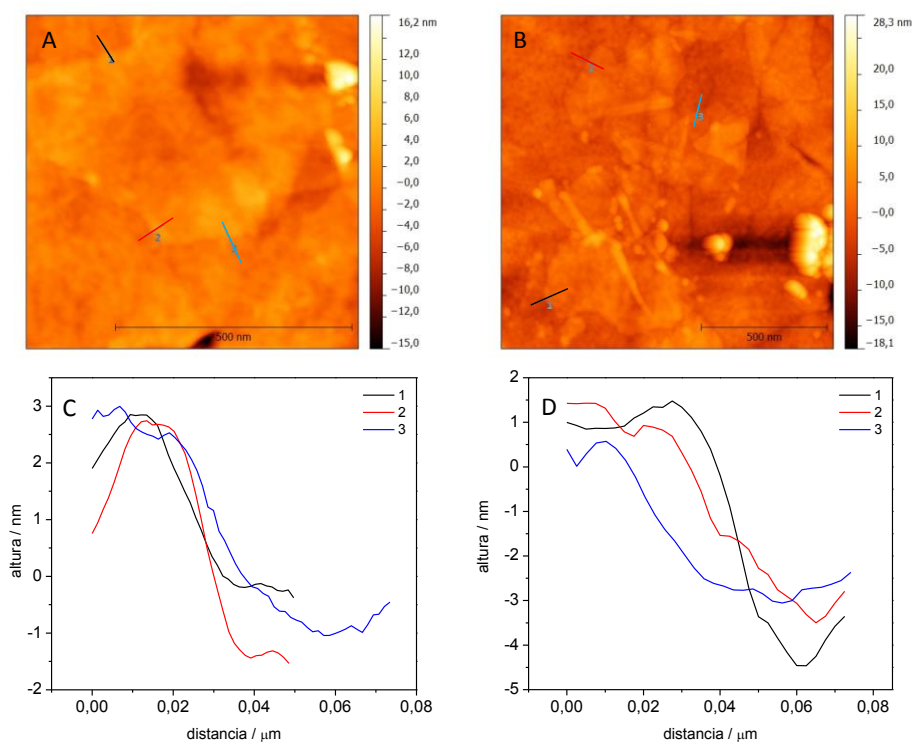


Fig. 71.A) y B) Imágenes de dos placas de oro modificadas con grafeno oxidado obtenidas mediante AFM en modo tapping para un área de  $600 \text{ nm}^2$  y  $1300 \text{ nm}^2$ , respectivamente. Fig. 71.C) y D) Perfil de altura correspondiente a la modificación de la placa de oro con grafeno oxidado 71.A y 71.B.

Una vez obtenidos los espesores promedio en ambos casos, mediante el software de modelización molecular GaussView y de dibujo molecular Chemdraw se calculó la altura teórica de la molécula de cistamina en 0.5 nm, mientras que una única lámina de grafeno oxidado posee un espesor aproximado de 1 - 1.2nm [164]. Por tanto, el número de láminas de grafeno oxidado depositado mediante esta metodología de modificación calculado mediante AFM se estimaría en tres o cuatro. Además, la similitud del número de láminas de grafeno oxidado estimado para ambas placas, hace suponer que el procedimiento de modificación superficial descrito implica cierta homogeneidad respecto al número de láminas de grafeno depositadas.

#### **2.4. Caracterización mediante elipsometría espectroscópica.**

La elipsometría espectroscópica es una técnica que se está utilizando cada vez con mayor asiduidad en la caracterización de las propiedades del grafeno. Esto es debido a que permite estudiar el espesor, la extensión de los defectos superficiales, las propiedades ópticas y electrónicas de este nuevo nanomaterial mediante un análisis no destructivo. En el presente trabajo se estimó el número de láminas de grafeno oxidado depositadas sobre una placa de oro modificada con cistamina mediante el tratamiento de los datos obtenidos a través de la elipsometría espectroscópica. Para ello, se obtuvieron los espectros elipsométricos en el visible, de 495 a 275 nm, tras cada etapa de la modificación, como se muestra en la figura 72. Como se puede observar, una vez modificada la superficie de oro con cistamina (círculos) se aprecia una disminución de la función elipsométrica  $\Delta$ , mientras que la función  $\Psi$  apenas experimenta variación significativa. Este comportamiento es característico de

modificaciones superficiales donde se produce un incremento en la rugosidad de la superficie. El acoplamiento del grafeno oxidado sobre la capa de cistamina (triángulos), induce una variación importante en ambas funciones elipsométricas,  $\Delta$  y  $\Psi$ , en el intervalo espectral. Con el objetivo de analizar la uniformidad de la modificación, se ha escaneado la superficie en distintos puntos de la placa, registrándose desviaciones inferiores al 1%; por tanto se considera que los datos obtenidos mediante esta técnica instrumental son lo suficientemente robustos para poder cuantificar el espesor del recubrimiento de grafeno oxidado.

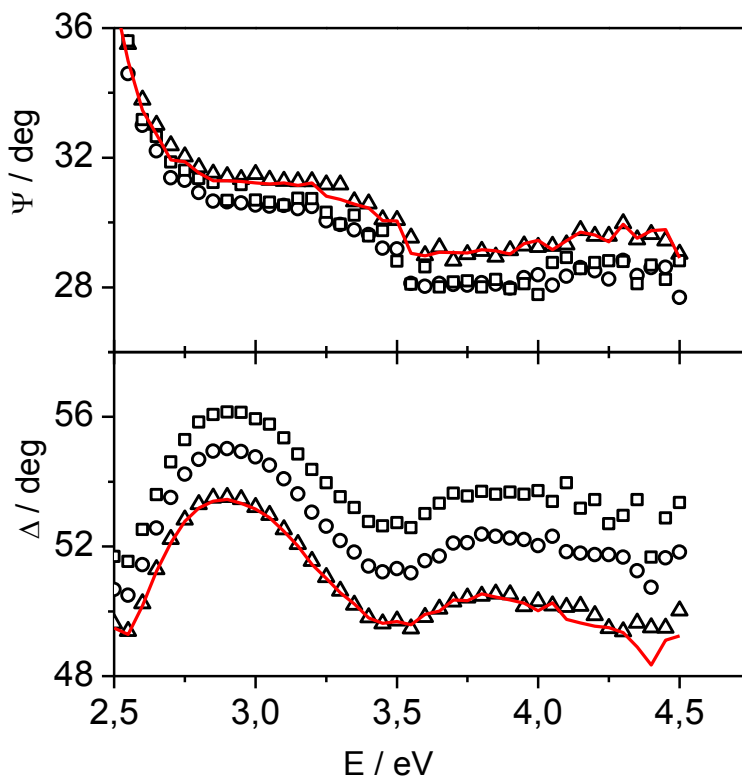


Fig. 72. Variación de la amplitud ( $\Psi$ ) y fase ( $\Delta$ ) en función de la energía del haz incidente de una placa de oro sin modificar (cuadrados), tras ser modificada con

cistamina (círculos) y tras llevar a cabo la reacción de acoplamiento EDC/NHS y grafeno oxidado (triángulos).

Dado que la modificación con cistamina apenas provoca cambios en el parámetro  $\Psi$ , o fase, se puede utilizar el modelo de una única capa para llevar a cabo el estudio del espesor inducido por la presencia de grafeno oxidado. Asimismo, si se considera que nos encontramos ante un depósito heterogéneo, donde la fase correspondiente al grafeno oxidado es mayoritaria respecto a la superficie de oro, se puede utilizar la aproximación de Maxwell-Garnett (MG) del medio efectivo, que se describió en el capítulo introductorio, para calcular el espesor del depósito. Las constantes ópticas del grafeno oxidado, índice de refracción ( $n$ ) y coeficiente de extinción ( $k$ ), necesarias para realizar la simulación de los datos experimentales han sido obtenidas del trabajo desarrollado por X.B. Wang y colaboradores [130]. Del ajuste de los datos experimentales mediante el modelo Maxwell-Garnett y una única capa, y considerando recubrimientos superficiales del 60, 80 y 100 % se obtienen valores para el espesor de la película de grafeno oxidado de 2.1, 1.7 y 1.4 nm, respectivamente.

La elipsometría es una técnica que presenta una gran sensibilidad en el cálculo del espesor de un depósito, pudiendo discriminar películas incluso de decenas de angstroms [165]. No obstante, para películas no homogéneas, como es el caso, el espesor obtenido representa un valor promedio del área del haz de luz incidente, que se extiende sobre varios  $\text{mm}^2$  de muestra. Este valor, con el fin de que sea representativo, necesita de una posterior corrección con el recubrimiento superficial, que debe ser obtenido por otras técnicas como por ejemplo microscopía SEM. A partir de las imágenes obtenidas anteriormente mediante SEM, se ha estimado que el recubrimiento de la superficie de oro recubierta con grafeno oxidado, es de aproximadamente el 60% de la superficie total. En



consecuencia, de acuerdo con lo calculado y descrito en el párrafo anterior el espesor de la lámina de grafeno oxidado sería de 2.1 nm, valor que corresponde a dos o tres láminas de grafeno oxidado.

Este valor coincide con el calculado por AFM. Por tanto, se puede afirmar que el grafeno oxidado depositado tiene entre 2 y 4 láminas.

El procedimiento de modificación descrito en el presente capítulo permite modificar de manera sencilla, estable y reproducible superficies de oro con grafeno oxidado. Por tanto puede servir como punto de partida para llevar a cabo el diseño y la fabricación de plataformas sensoras y biosensoras que puedan presentar propiedades novedosas y mejoradas.

## **2.5. Caracterización mediante microscopía Raman.**

Actualmente la microscopía Raman se ha convertido, sin lugar a dudas, en la técnica más ampliamente utilizada para llevar a cabo la identificación y caracterización del grafeno tanto oxidado como reducido. Esto es debido a que materiales tan *a priori* similares como grafito pirolítico (HOPG), grafeno oxidado y grafeno reducido presentan diferencias significativas en sus respectivos espectros Raman, debido a la interacción de los átomos de carbono con diferente hibridación con la radiación Raman [166, 167]. En el presente trabajo, se hizo uso de esta técnica instrumental con el propósito de comprobar si tras el proceso de inmovilización el grafeno oxidado depositado conservaba su naturaleza; ya que esta puede verse alterada por el proceso de inmovilización.

En la figura 73.A se recogen los espectros Raman de una placa de oro en una zona donde se encuentra la superficie de oro limpia

(línea discontinua) y en un area donde se ha efectuado la modificación con grafeno oxidado (línea continua). El espectro Raman obtenido con un láser de HeNe a 532 nm presenta dos bandas muy intensas a 1347 y 1598  $\text{cm}^{-1}$ , que se corresponden con las bandas D y G del grafeno oxidado, respectivamente (Fig. 73.B). La banda D solamente se observa en el espectro Raman del grafeno oxidado, no aparece en el caso del grafeno reducido ni del grafito pirolítico (HOPG). Es indicativa de la presencia de carbonos  $\text{sp}^3$ , por lo que está asociada a la presencia de defectos en la estructura, tales como grupos hidroxilo y epóxidos en las zonas basales o de grupos funcionales ácido carboxílico o carbonilo en los extremos. Por otro lado, la banda G se asocia a la vibración en el plano del carbono con hibridación  $\text{sp}^2$ , por lo que es activa tanto para el grafeno oxidado como en los demás compuestos de carbono. En el caso del grafeno oxidado esta banda sufre un desplazamiento a mayor frecuencia, ó desplazamiento al azul, respecto a la banda observada en el grafeno (1586  $\text{cm}^{-1}$ ). Este aumento en la frecuencia de vibración está causado por la presencia de dobles enlaces aislados en la estructura [166].

La deconvolución de todas las bandas del espectro Raman, recogidas en las figuras 73.B y 73.C, se han ajustado a un modelo de función lorentziana mediante el programa de tratamiento de datos Origin 8.1. En el intervalo de 2500 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  se aprecian, además de las bandas D y G, tres bandas de muy poca intensidad (Fig 73.A). La primera banda aparece a 2691  $\text{cm}^{-1}$ , es la denominada 2D, un sobretono de la banda D. De estas tres bandas, ésta es la que presenta mayor utilidad analítica pues de su posición, anchura y forma se puede extraer información acerca del número de láminas y del grado de ordenación de los dominios de la muestra de grafeno analizada. Posteriormente se observa otra a 2932  $\text{cm}^{-1}$ , suma de las contribuciones de las bandas D y G y finalmente a 3177  $\text{cm}^{-1}$  que se debe al sobretono del pico 2D'.

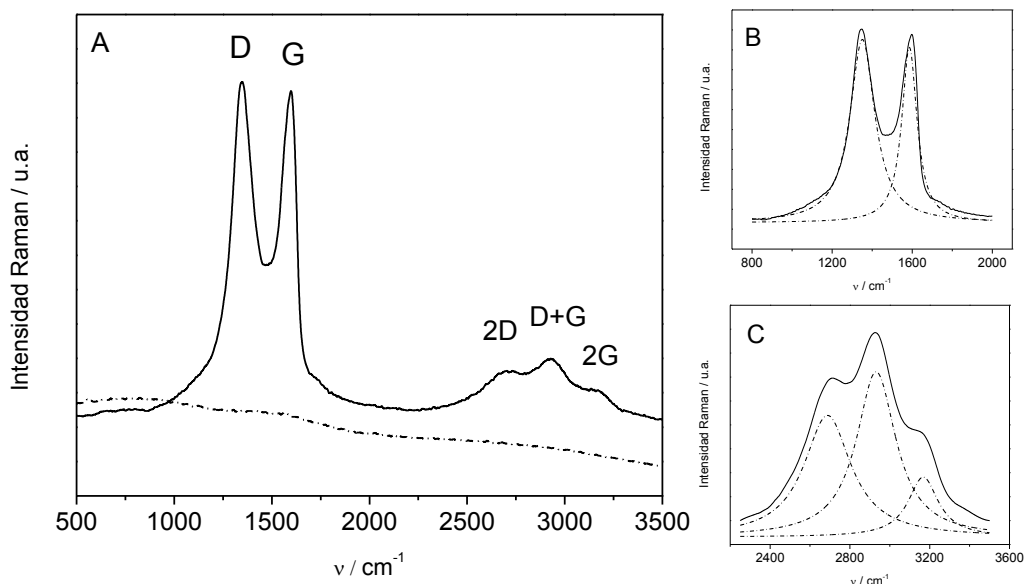


Fig. 73.A) Espectro RAMAN de una placa de oro (línea discontinua) y de una placa de oro modificada con grafeno oxidado mediante el acoplamiento con EDC/NHS a una SAM de cistamina (línea continua). Fig. 73.B) y C) Ampliación y deconvolución (línea discontinua) de los picos Raman correspondientes al grafeno oxidado de acuerdo a una función lorentziana.

La relación entre la intensidad de la banda D y G ( $I_D/I_G$ ), indica la proporción de carbonos con hibridación  $sp^2$  respecto a los que presentan hibridación  $sp^3$ . Tuinstra y Koenig establecieron para el caso del grafito, que este parámetro puede utilizarse como medida del grado de desorden estructural de la muestra. Así, valores más bajos en la relación  $I_D/I_G$ , se corresponden con una mayor extensión de los dominios cristalinos ( $L_a$ ) [168]. En 1999, Ferrari y Robertson [169] demostraron que los materiales amorfos de carbono, como el grafeno oxidado, cuyos valores de  $L_a$  son inferiores a 2 nm presentan una segunda fase de amorfización. La muestra de grafeno inmovilizada sobre oro analizada presenta un valor de  $L_a$  de 0.45nm por tanto se sitúa claramente en esta segunda fase de amorfización.

Los materiales que se enmarcan dentro de esta segunda fase, presentan además una inversión en su comportamiento, donde la presencia de dominios cristalinos más extensos está relacionado con valores más bajos de  $I_D/I_G$ , al contrario de lo que ocurre en el caso del grafito. En este caso, se ha obtenido un valor para la relación  $I_D/I_G$  de 1.0, que coincide con el obtenido en la caracterización del grafeno oxidado sintetizado [170] y es del mismo orden que los reportados en la literatura para modificaciones con grafeno oxidado en ausencia de recocido térmico (ó annealing) [171].

Un parámetro adicional utilizado para elucidar el grado de desorden estructural de la muestra es la medida de la anchura máxima en la semialtura de la banda (FWHM). Cuando el valor obtenido supera los  $40 \text{ cm}^{-1}$ , dichos compuestos se asignan a la segunda fase. En la tabla 6 se adjuntan los valores de la posición y anchura máxima en semialtura para el grafeno oxidado inmovilizado sobre superficies de oro modificadas con cistamina en este trabajo. Con fines comparativos se han incluido los valores reportados para grafeno oxidado depositado sobre un sustrato de óxido de silicio [170].

Tabla 6. Datos correspondientes a la posición y anchura en semialtura (ó FWHM) de los picos Raman de la placa de oro modificada con cistamina y grafeno oxidado y del mismo grafeno oxidado soportado sobre una placa de óxido de silicio.

<i>Banda</i>		D	G	2D	D+G	2D'
Au/cys/GO	<i>Posición (cm<sup>-1</sup>)</i>	1347	1598	2691	2932	3177
	<i>FWHM (cm<sup>-1</sup>)</i>	145	82	245	214	186
SiO <sub>2</sub> /Si/GO	<i>Posición (cm<sup>-1</sup>)</i>	1356	1591	2715	2931	3165
	<i>FWHM (cm<sup>-1</sup>)</i>	126	102	311	189	182

Como se deduce de los datos tabulados, no se observa una variación significativa en la posición de las bandas del grafeno oxidado depositado sobre un sustrato y otro. Por otra parte, la anchura de las bandas (FWHM) está directamente relacionada con la presencia de defectos estructurales. Los datos obtenidos apuntan a la existencia de cierto grado de desorden cristalino en ambas muestras.

Los resultados obtenidos indican que aunque el procedimiento de entrecruzamiento entre la cistamina y el grafeno oxidado altera levemente la estructura de este último, de ahí el ligero aumento en la anchura de la banda D, en general se mantiene su identidad estructural, ya que no se observa un aumento significativo de la anchura de pico, ni un desplazamiento en la posición de las bandas.

Se puede por tanto, afirmar que el procedimiento de modificación permite construir electrodos híbridos donde el grafeno oxidado esta soportado sobre superficies metálicas de oro mediante una monocapa autoensamblada, manteniendo su naturaleza y propiedades estructurales pese al procedimiento de modificación.

### **3. Electroinjerto de Azure A sobre electrodos híbridos Grafeno Oxidado/Oro.**

Una vez se ha caracterizado en profundidad la naturaleza y propiedades del dispositivo híbrido desarrollado, el siguiente objetivo fue llevar a cabo la modificación de su superficie mediante el electroinjerto de Azure A, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

En la figura 74.A y 74.B se recoge la respuesta ciclovoltamperométrica de dos electrodos modificados mediante

electroinjerto ó adsorción de Azure A, respectivamente. En la imagen 74.A, correspondiente al electroinjerto de Azure A se observan dos procesos en el barrido catódico, análogamente a lo observado sobre los electrodos de oro y de carbono. El primero de ellos centrado en +0.20 V se adscribe a la reducción del Azure A; el segundo, centrado en +0.09 V, esta causado por la reducción de la fenotiazina. En el barrido anódico se observa un único proceso, a +0.24 V, que se asocia a la oxidación del Azure A. En la figura 74.B, donde no se ha realizado el procedimiento de electroinjerto, se observa un único par redox con un proceso anódico a +0.13 V y uno catódico a +0.18 V, que corresponde a la oxidacion reducción de la fenotiazina, respectivamente.

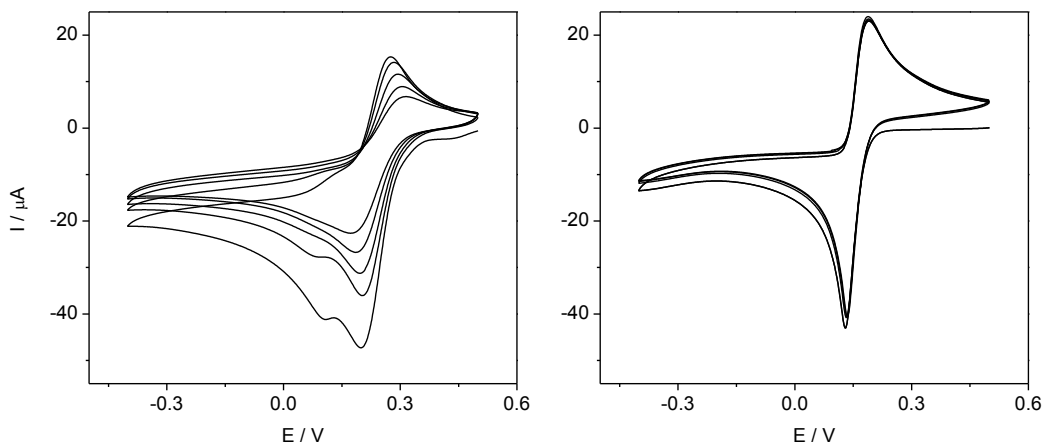


Fig. 74. Voltamperogramas cíclicos del procedimiento de electroinjerto del Azure A (5 mM) diazotado (A) y sin diazotar (B) en electrodos de oro modificados con grafeno oxidado.

En la figura 74.A correspondiente al electroinjerto de Azure A sobre electrodos híbridos Grafeno oxidado/Oro (GO/Au), se aprecia una disminución de la intensidad de pico anódica y catódica con los sucesivos ciclos de potencial, al igual que ocurría con los electrodos

de oro. Este comportamiento parece indicar, como en el caso anterior, la formación de una película de material menos conductora causada por el crecimiento en multicapas de la película electroactiva.

Tal como se procedió con anterioridad, el siguiente paso consistió en estudiar la respuesta del electrodo modificado en ausencia de especie electroactiva. En la figura 75 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para electrodos modificados con Azure A mediante electroinjerto o adsorción. Cuando la superficie electródica se modifica mediante electroinjerto (línea continua) se aprecia un proceso redox muy intenso que presenta un pico anódico centrado en +0.12 V y un pico catódico en -0.02 V, correspondiente a la oxidación / reducción de la fenotiazina electroinjertada. Asociado a éste y desplazado a un potencial más negativo, se observa un proceso muy mal definido que corresponde a la adsorción del Azure A (línea discontinua). Por consiguiente, pese a que el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre el electrodo de oro recubierto con grafeno oxidado conlleva una contribución de adsorción inespecífica, ésta es prácticamente insignificante comparado con el electroinjerto.

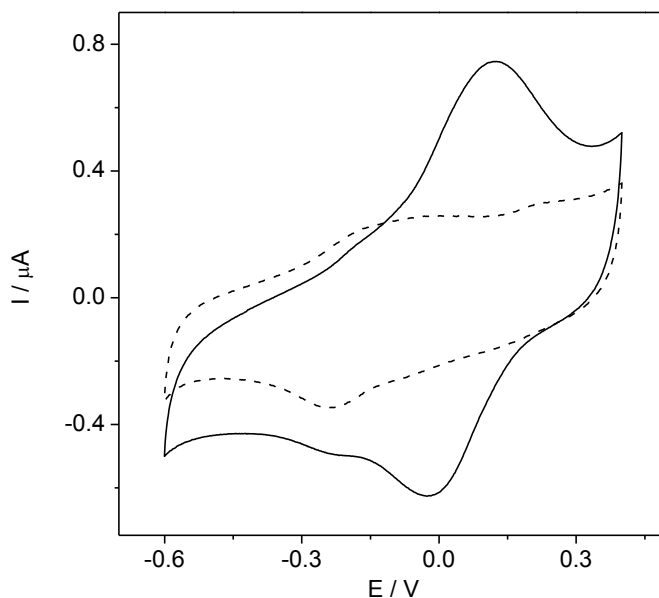


Fig. 75. Voltamperogramas cíclicos (ciclo número 20) de los electrodos de GO/Au modificados con Azure A (5mM) diazotado (línea continua) y sin diazotar (línea discontinua) obtenidos en tampón fosfato 0.1M pH7 a 100mV/s.

Con el objetivo de evaluar si la naturaleza de la superficie electródica influía en el potencial, se compararon los potenciales de pico del sistema redox correspondiente al Azure A sobre electrodos híbridos grafeno oxidado/oro con los electrodos descritos anteriormente. Puesto que el electrodo de referencia utilizado en los electrodos serigrafados de carbono es una tinta de plata, y por tanto es diferente al electrodo de referencia de Ag/AgCl utilizado en las medidas en celda electroquímica convencional, el potencial al que se observan los procesos redox no es unívoco en todos los electrodos. Por consiguiente, con fines comparativos se llevó a cabo el electroinjerto de Azure A sobre un electrodo de carbono vítreo en las mismas condiciones experimentales que el electroinjerto sobre electrodos de oro y grafeno oxidado/oro. En la tabla 7 se recogen los valores de los potenciales de pico, así como la diferencia de los



potenciales de pico para los electrodos de carbono vítreo, de oro y de grafeno oxidado/oro.

Tabla 7. Valores de los potenciales anódico y catódico, y de la diferencia de potenciales de pico de los distintos materiales utilizados como electrodos modificados mediante electroinjerto de Azure A.

<i>Electrodo</i>	<i>Ep<sub>a</sub> (V)</i>	<i>Ep<sub>c</sub> (V)</i>	<i>ΔEp (V)</i>
<i>Oro</i>	<i>+ 0.14</i>	<i>- 0.06</i>	<i>0.08</i>
<i>Grafeno oxidado / oro</i>	<i>+ 0.12</i>	<i>- 0.02</i>	<i>0.10</i>
<i>Carbono vítreo</i>	<i>+ 0.08</i>	<i>- 0.08</i>	<i>0.10</i>

En el caso de los electrodos híbridos GO/Au se aprecia que el potencial de pico anódico del Azure A presenta un valor intermedio respecto al oro y al carbono vítreo, pese a que el proceso de reducción de la fenotiazina se desplaza a potenciales más negativos. La diferencia de potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ) en los electrodos sometidos a estudio presenta una gran similitud y en todos los casos el potencial formal del sistema es próximo a + 0.0 V, especialmente en el caso del carbono vítreo. Los resultados obtenidos para la oxidación-reducción del colorante Azure A sobre las distintas superficies indican que el material utilizado como transductor no afecta especialmente a los potenciales de pico a los que se observa la respuesta del Azure A. Esto puede ser debido a que el procedimiento de electroinjerto facilita en gran medida la oxidación-reducción del colorante sobre la superficie del transductor.

### **3.1. Estudio del electroinjerto de Azure A sobre electrodos híbridos GO/Au mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM).**

#### **3.1.1. Propiedades de la película electroactiva.**

Con el fin de estudiar *in situ* el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre el dispositivo híbrido GO/Au, se utilizó la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo procediendo de manera análoga al estudio desarrollado en el capítulo anterior. Así, tras modificar la superficie del electrodo de oro del oscilador de cuarzo con grafeno oxidado se realizó el procedimiento de electroinjerto bajo condiciones de temperatura controlada, y se monitorizó la variación de la frecuencia de resonancia durante el proceso.

En la figura 76.A se muestran los voltamperogramas cíclicos correspondientes a la etapa de electroinjerto de Azure A, observándose el comportamiento esperado, ya que se aprecia una disminución de la intensidad de pico al aumentar el número de ciclos de potencial. En la figura 76.B, se recoge la variación de la frecuencia de resonancia del cristal en función del potencial aplicado. Se puede observar una disminución gradual en la frecuencia tras cada ciclo de potencial, confirmando que se produce el electroinjerto de Azure A también sobre el electrodo híbrido. Además, al igual que ocurría sobre los electrodos de oro, la disminución en la frecuencia debida al aumento de la cantidad de material electroinjertado, se produce en el barrido de reducción. Por el contrario, el valor de la resistencia aumenta en función del número de ciclos de electroinjerto de Azure A aplicados (Fig. 76.C), este aumento implica que el procedimiento de electroinjerto provoca una disipación de la energía del oscilador.

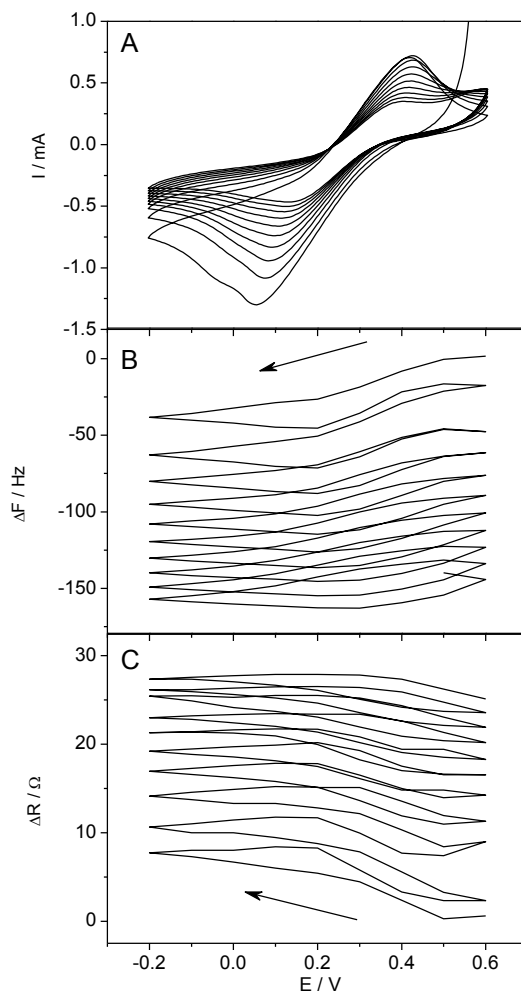


Fig. 76.A) Voltamperogramas cíclicos correspondientes al procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre el electrodo de oro de un oscilador de cuarzo modificado con grafeno oxidado (5mM, 10 ciclos, 100mV/s). Fig. 76.B) y C) Variación de la frecuencia de resonancia y de la resistencia durante el proceso de electroinjerto de Azure A.

Una vez obtenidos los valores de la variación de la frecuencia y de la resistencia sobre los electrodos híbridos grafeno oxidado/oro, es posible establecer una comparativa con los resultados obtenidos para los electrodos de oro modificados con Azure A estudiados en el

anterior capítulo. En las figuras 77. A y B, se muestra la variación de la frecuencia y la resistencia, respectivamente, en función del número de ciclos de electroinjerto para ambos electrodos. En la figura 77.A, como se puede apreciar al comparar ambos resultados, la variación de la frecuencia de resonancia sobre el electrodo híbrido GO/Au es mucho mayor que cuando se produce sobre el electrodo de oro. Este hecho, como se apuntó con anterioridad, está motivado por la mayor relación superficie-volumen del grafeno oxidado que permite electroinjetar un mayor número de moléculas de Azure A sobre su superficie. Por otra parte, en la figura 77.B se aprecia una mayor variación en la resistencia del oscilador cuando se produce el electroinjerto sobre el electrodo modificado con grafeno oxidado. Este hecho está directamente relacionado con un aumento en la disipación energética de la película electroinjetada y puede ser debido a que en este caso el electroinjerto se produce sobre la lámina de grafeno oxidado que está unida al electrodo mediante una monocapa de cistamina. Este ensamblado es lógicamente mucho menos compacto que la superficie de oro, por tanto durante el procedimiento de electroinjerto la disipación de la energía del oscilador puede verse influenciada por esta falta de rigidez.

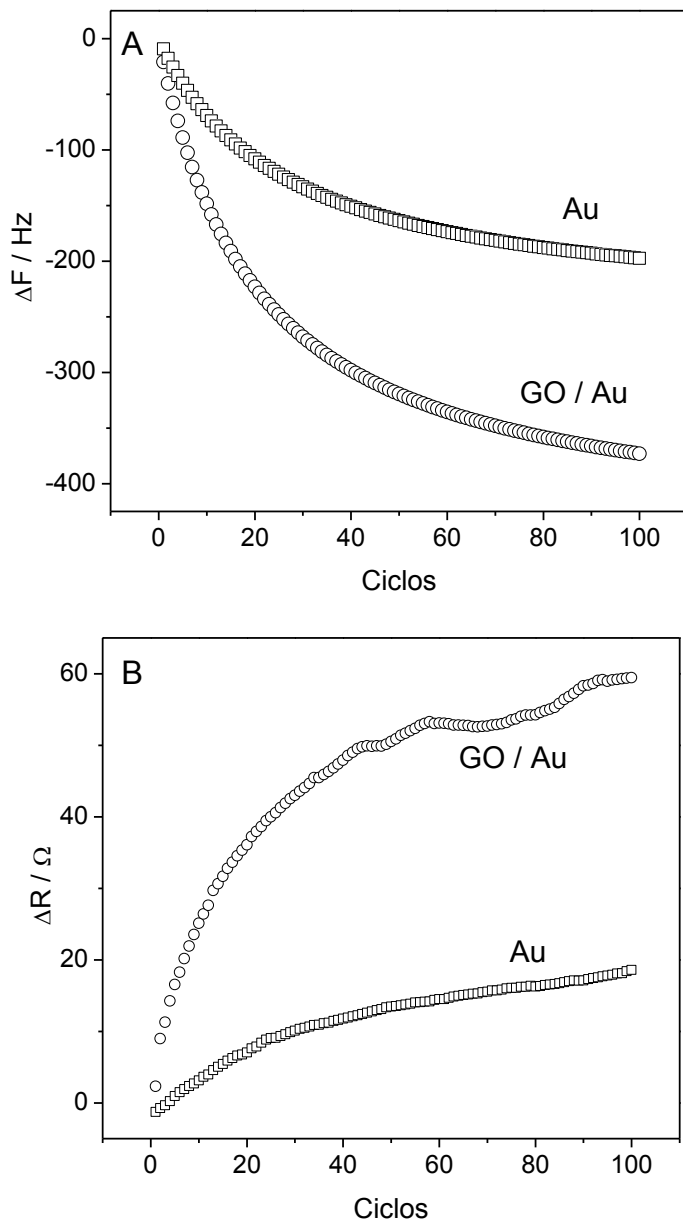


Fig. 77. Variación en la frecuencia de resonancia (A) y resistencia (B) obtenida en función del número de ciclos aplicados en el procedimiento de electroinjerto de Azure A (5 mM, 100 mVs<sup>-1</sup>) sobre electrodos de oro (cuadros) o sobre electrodos de oro modificados con grafeno oxidado (círculos).

La relación entre la variación de la resistencia y la variación de la frecuencia de resonancia,  $\Delta R/\Delta F$ , permitió evaluar las propiedades viscoelásticas de la película electroinjerada, tal como se procedió para el caso del electroinjerto sobre electrodos de oro. En la figura 78 se representa la variación de  $\Delta R/\Delta F$  en función del número de ciclos de electroinjerto tanto para electrodos híbridos GO/Au como para electrodos de oro. Los valores obtenidos sobre electrodos de oro modificados con grafeno oxidado son significativamente mayores que los correspondientes a electrodos de oro; lo que confirma que en el caso de los osciladores modificados con grafeno el proceso de electroinjerto conlleva una mayor disipación energética que puede deberse bien a que el electroinjerto de Azure A origina una película con mayor viscoelasticidad, lo cual implicaría que la naturaleza de la superficie electródica condiciona las propiedades viscoelásticas de la película de Azure A, o bien que el ensamblaje del grafeno sobre el electrodo de oro del oscilador de cuarzo no es compacto.

Además, en la figura 78 se puede observar que cuando el electroinjerto de Azure A se lleva a cabo sobre el electrodo híbrido GO/Au, la tendencia de la relación  $\Delta R/\Delta F$  durante los primeros ciclos es completamente opuesta a la observada sobre la superficie de oro. En el caso del electrodo híbrido, la relación  $\Delta R/\Delta F$  permanece prácticamente constante durante los diez primeros ciclos de potencial y después disminuye hasta alcanzar de nuevo un valor constante tras 25 ciclos, con algunas fluctuaciones presumiblemente debidas al acondicionamiento en el empaquetado de moléculas de Azure A. Este comportamiento se puede interpretar en base a que el material electroinjerado durante los primeros ciclos tiende a ser más flexible, pero a medida que nuevas moléculas de Azure A se incorporan a la superficie electródica se producen interacciones laterales intermoleculares que dotan a la película de una mayor rigidez y de un carácter menos disipativo, dando lugar a una disminución de los

valores de  $\Delta R/\Delta F$ . Sin embargo, cuando el electroinjerto de la fenotiazina se realiza sobre los electrodos de oro, la relación  $\Delta R/\Delta F$  aumenta linealmente durante los primeros 20 ciclos de potencial hasta alcanzar un valor constante. Este aumento inicial se corresponde con la formación de un material con propiedades viscoelásticas. Es interesante destacar que tras 25 ciclos de electroinjerto ambos electrodos presentan un comportamiento similar, ya que la relación  $\Delta R/\Delta F$  se mantiene constante, lo que indica que la presencia de multicapas conlleva la formación de un material rígido, en lugar de viscoelástico.

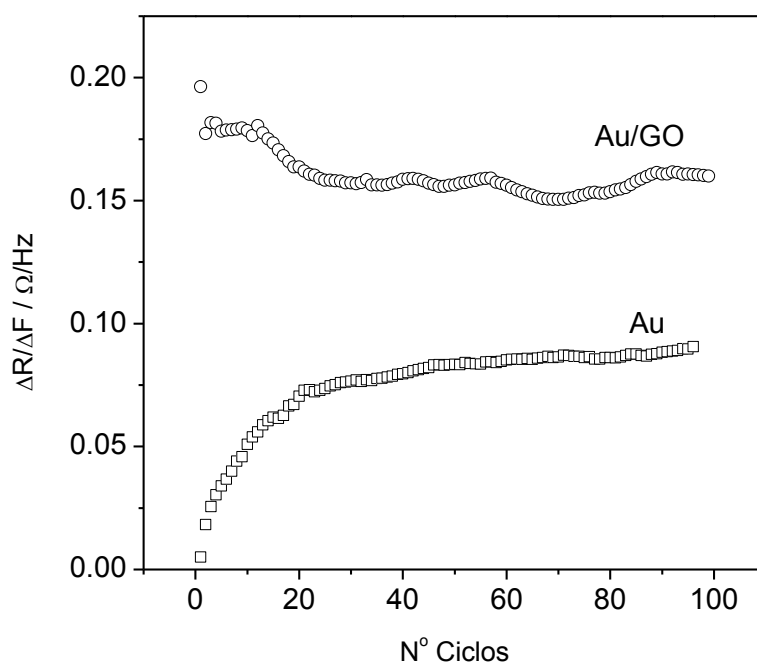


Fig. 78. Representación de la variación del parámetro  $\Delta R/\Delta F$  en función del número de ciclos de electroinjerto para un electrodo de oro (cuadrados) o bien para un electrodo de oro modificado con grafeno oxidado (círculos).

Las diferencias observadas en la variación de la relación  $\Delta R/\Delta F$  durante el electroinjerto de las primeras capas de Azure A cuando se

compara el comportamiento sobre los electrodos híbridos con los de oro, pone de manifiesto que dicho proceso es altamente dependiente de la rigidez de la superficie sobre la que se lleva a cabo.

### 3.1.2. Estudio de la cinética de electroinjerto.

Una vez determinadas las propiedades viscoelásticas de la película electroactiva se estudió la cinética de electroinjerto a través de las variaciones *in situ* de la frecuencia de resonancia en función del número de ciclos de potencial. Para ello es necesario asumir dos consideraciones; primera, que el procedimiento de electroinjerto de la película de Azure A es un proceso irreversible, es decir no se produce desorción espontánea de las moléculas ya electroinjetadas, y segundo que la película electroinjetada presenta propiedades rígidas, donde se cumple la ecuación de Sauerbrey. Bajo estas condiciones es posible estudiar la cinética de electroinjerto sobre ambas superficies. Para ello se ha calculado la cantidad de Azure A electroinjetado, en términos de recubrimiento superficial a partir del cambio de masa asociada a cada disminución de la frecuencia. En la figura 79 se recoge la representación del recubrimiento de Azure A en función del número de ciclos de electroinjerto. Los datos experimentales se han ajustado mediante el software de tratamiento de datos Origin 8.0 al modelo de regresión no lineal propuesto por Box y Lucas [172], una función tal que:

$$\Gamma = \Gamma_{max} [1 - \exp(-k \cdot N)] \quad (17)$$

Donde  $\Gamma$  es el recubrimiento superficial calculado a partir de la masa determinada mediante la ecuación de Sauerbrey;  $\Gamma_{max}$  es el recubrimiento máximo que puede alcanzarse mediante el procedimiento de electroinjerto, en  $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; N el número de ciclos de electroinjerto y k la constante cinética del procedimiento de



electroinjerto en  $\text{mol}\cdot\text{ciclos}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Este modelo de regresión no lineal ha sido previamente utilizado en el estudio del crecimiento polimérico mediante la formación de multicapas del ácido poliacrílico (PAA) y del hidrocloreuro de polialilamina (PAH) sobre pentóxido de tantalio [173]. Por tanto, este modelo teórico puede ser aplicado al estudio de la cinética de formación y crecimiento de las películas electroactivas de Azure A.

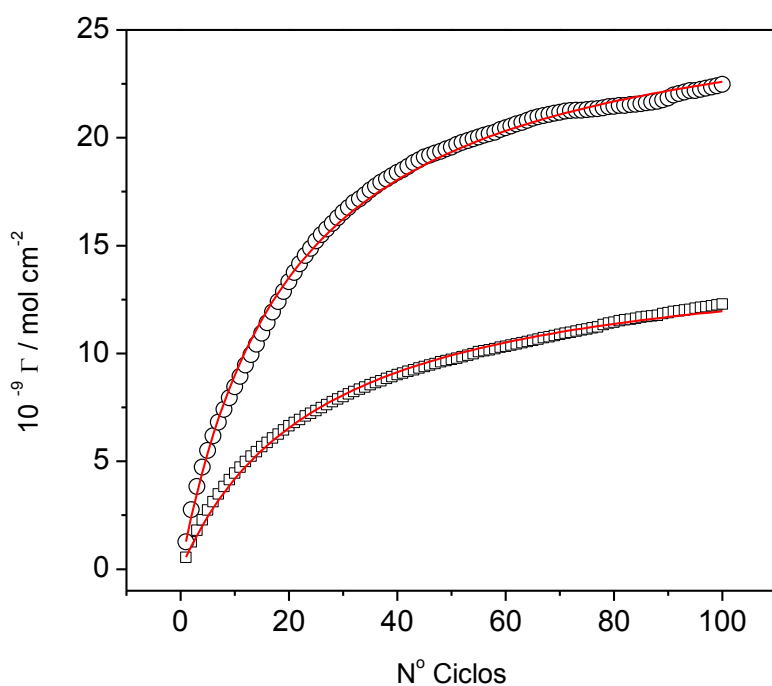


Fig. 79. Recubrimiento superficial calculado a partir de los datos de la variación en la frecuencia de resonancia mediante la aplicación de la ecuación de Sauerbrey en el procedimiento de electroinjerto de Azure A para electrodos de oro (cuadros) o para electrodos de oro modificados con grafeno oxidado (círculos). La línea roja representa el ajuste de los datos experimentales a la función exponencial descrita en la ecuación 1.

Tras llevar aplicar el modelo de regresión no lineal de Box-Lucas, se observa que los datos experimentales se ajustan bien a la predicción teórica. En la tabla 8 se recogen los datos correspondientes al ajuste según la ecuación 1, tanto para electrodos de oro como para electrodos de oro modificados con grafeno oxidado.

Tabla 8. Constante cinética ( $k$ ) y recubrimiento superficial máximo ( $\Gamma_{max}$ ) calculados mediante el ajuste de los datos obtenidos mediante el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre electrodos de oro o de oro modificado con grafeno oxidado.

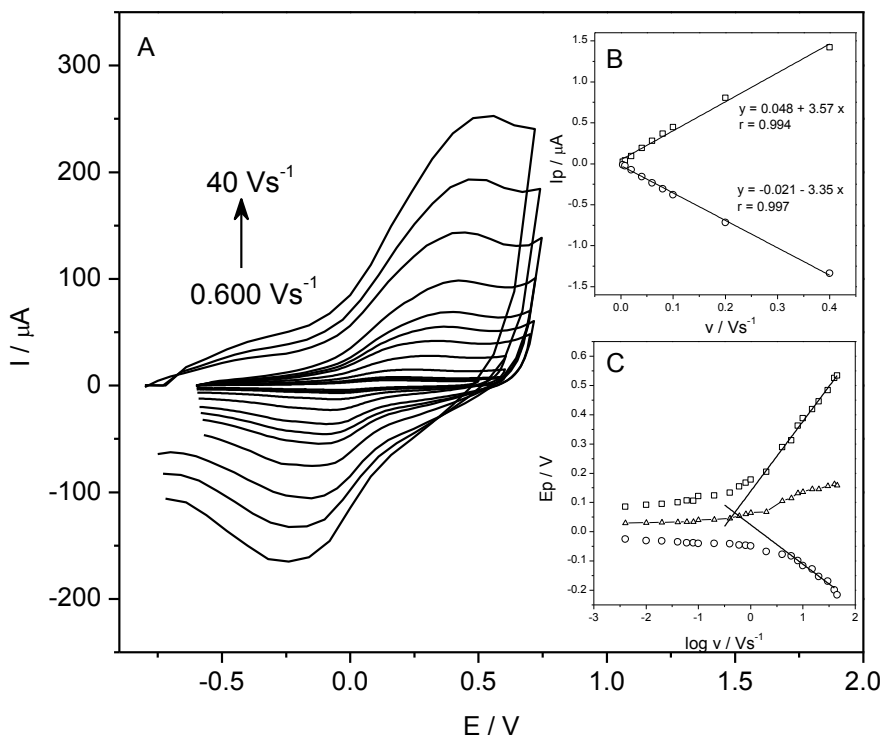
	$10^9 \cdot \Gamma_{max}$ ( $mol \cdot cm^{-2}$ )	$10^2 \cdot k$ ( $mol \cdot ciclo^{-1} \cdot cm^{-2}$ )	$r$
<i>Electrodo Au</i>	$11.9 \pm 0.09$	$3.80 \pm 0.08$	$0.991$
<i>Electrodo GO/Au</i>	$22.0 \pm 0.06$	$4.95 \pm 0.07$	$0.998$

El valor más alto de la constante cinética del proceso ( $k$ ) para los electrodos de oro recubiertos con grafeno oxidado refleja que el procedimiento de electroinjerto de Azure A se da con mayor facilidad sobre estos últimos. Asimismo, se confirma que este nanomaterial da lugar al electroinjerto de una mayor cantidad de material por unidad de área como se desprende del valor del recubrimiento máximo ( $\Gamma_{max}$ ) obtenido que es el doble del recubrimiento máximo alcanzado sobre electrodos de oro.

### **3.2. Cinética de transferencia electrónica a través de películas electroinjertadas de Azure A sobre electrodos GO/Au.**

Con el fin de analizar la cinética de transferencia electrónica a través de las películas electroactivas de Azure A, se realizaron estudios mediante voltametría cíclica. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que el utilizado en el caso de los electrodos de oro. De la representación de la intensidad de corriente y el potencial de pico en función de la velocidad de barrido de potencial se obtuvieron los parámetros que permiten evaluar la cinética de transferencia electrónica para electrodos de oro modificados con láminas de grafeno oxidado. En la figura 80.A y 80.D se recogen los voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados con 10 y 100 ciclos de electroinjerto a velocidades de barrido entre 0.6 V y 40 V. En las figuras 80.B y 80.E se muestran las representaciones de la intensidad de pico en función de la velocidad de barrido, en ambos casos la intensidad es proporcional a la velocidad de barrido lo que indica que el Azure A se encuentra inmovilizado sobre la superficie del electrodo híbrido.

Por otra parte, en las figuras 80.C y 80.F se muestra la representación del potencial de pico respecto al logaritmo de la velocidad de barrido. Cuando el electrodo ha sido modificado con 100 ciclos de electroinjerto se observa que la diferencia entre los potenciales de pico sugiere la existencia de limitaciones cinéticas en la transferencia de carga, para velocidades superiores a  $0.04 \text{ Vs}^{-1}$ ; mientras que cuando ha sido modificado con 10 ciclos de electroinjerto este hecho se produce a velocidades superiores a  $0.8 \text{ Vs}^{-1}$ .



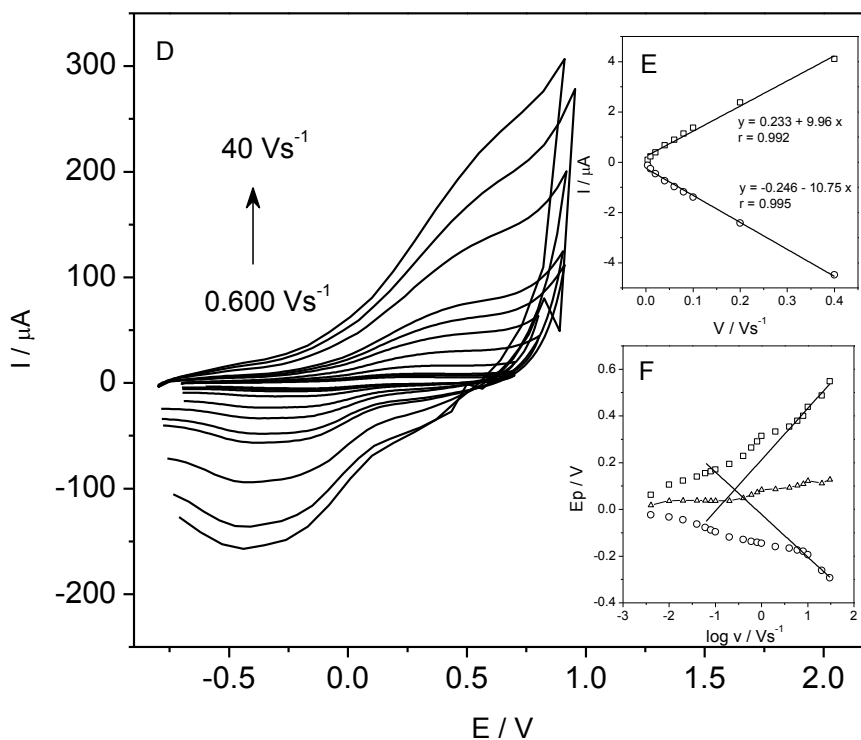


Fig. 80.A) y D) Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con 10 y 100 ciclos de electroinjerto en tampón fosfato pH 7 (0.1M) a distintas velocidades de barrido. Inserto B) y E) Representación de la intensidad de pico anódico (cuadrados) y catódico (círculos) en función de la velocidad de barrido para los electrodos descritos en A y D, respectivamente. Inserto C) y F) Gráfica de la dependencia del potencial de pico anódico (cuadrados negros) y catódico (triángulos rojos) en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

A partir de los estudios que describen el efecto de la velocidad de barrido y mediante el método descrito por Laviron [131] se calcularon  $K_s$  y  $\alpha$ . En la tabla 9 se resumen los valores obtenidos para el electrodo híbrido GO/Au y para el electrodo de oro.

Tabla 9. Valores correspondientes a la constante de transferencia de carga ( $k_s$ ) y al coeficiente de transferencia ( $\alpha$ ) para electrodos de oro y de oro modificado con grafeno oxidado tras la aplicación de 10 y 100 ciclos de electroinjerto de Azure A.

	<i>10 ciclos</i>		<i>100 ciclos</i>	
	$k_s$ ( $s^{-1}$ )	$\alpha$	$k_s$ ( $s^{-1}$ )	$\alpha$
<i>Electrodo Au</i>	<i>4</i>	<i>0.44</i>	<i>0.8</i>	<i>0.74</i>
<i>Electrodo GO/Au</i>	<i>14</i>	<i>0.41</i>	<i>4</i>	<i>0.29</i>

Como se desprende de los datos tabulados, los electrodos modificados con 10 ciclos de electroinjerto muestran en ambos casos, una constante de transferencia heterogenea de transferencia electrónica de un orden de magnitud mayor que los obtenidos con 100 ciclos. Asimismo, presentan valores para el coeficiente de transferencia,  $\alpha$ , más próximos a 0.5, indicativo de que el  $E^o$  no varía con la velocidad de barrido. Los electrodos GO/Au obtenidos, incluso con depósitos de mayor espesor (100 ciclos), presentan una cinética de transferencia electrónica más rápida que los electrodos de oro modificados bajo las mismas condiciones.

En conclusión, los resultados obtenidos para los electrodos GO/Au modificados con películas electroinjertadas, confirman que la presencia de grafeno oxidado mejora sustancialmente la cinética de transferencia electrónica a través de la película de Azure A.

#### **4. Estudio de la oxidación electrocatalítica de NADH sobre electrodos GO/Au modificados con Azure A.**

Como se ha descrito anteriormente, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el diseño y la fabricación de dispositivos capaces de sensor la oxidación de NADH, con el fin de poder desarrollar biosensores basados en enzimas deshidrogenasas. De modo que, es necesario estudiar el comportamiento del electrodo híbrido grafeno oxidado/oro modificado mediante electroinjerto de Azure A frente a la electrooxidación de NADH.

En la figura 81 se ha muestra la respuesta del electrodo híbrido GO/Au sin modificar y modificado con 10 ciclos de electroinjerto en ausencia (línea discontinua) y en presencia de NADH 1mM (línea continua). En el caso de electrodos modificado y ausencia de NADH se obtiene la respuesta característica del Azure A. Sin embargo, en presencia de NADH se aprecia un aumento de la intensidad de pico anódica concomitante con una disminución de la intensidad catódica, comportamiento que se corresponde con un fuerte efecto electrocatalítico (Fig. 81.B). En la figura 81.A se muestra el pico debido a la oxidación de NADH sobre películas electroinjertadas de Azure A se observa a un potencial de +0.27 V, lo que representa una disminución en el sobrepotencial de 0.40 V respecto al electrodo GO/Au sin modificar que es de +0.65 V.

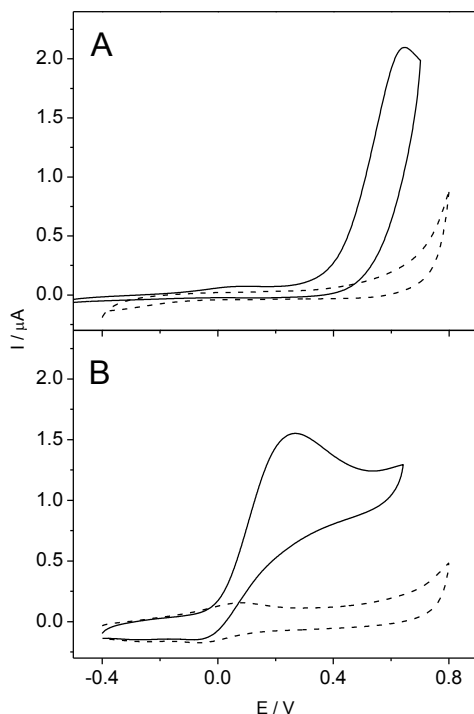


Fig. 81.A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro modificado con grafeno oxidado en tampón fosfato (línea discontinua) o en presencia de NADH (1 mM) (línea continua). Fig. 81.B) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro modificado con grafeno oxidado y con Azure A en tampón fosfato (línea discontinua) o en presencia (línea continua) de NADH (1mM). Velocidad de Barrido  $10\text{mVs}^{-1}$ .

La eficiencia catalítica,  $I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}}$ , permite evaluar la respuesta neta debida a la electrooxidación de NADH independientemente del recubrimiento de Azure A, factor que en principio podría ser una causa de variabilidad en la electrocatálisis, dado que el recubrimiento superficial de Azure A sobre electrodos GO/Au es claramente superior al obtenido sobre electrodos de oro, como se ha demostrado con anterioridad. Los valores de eficiencia catalítica calculados para los electrodos de oro y de oro con grafeno oxidado modificados con



películas de Azure A, bajo las condiciones óptimas, frente a la catálisis de NADH, fueron 4.3 y 10 respectivamente. La eficiencia catalítica sobre electrodos GO/Au, es el doble que la obtenida sobre electrodos de oro.

El resultado obtenido, confirma la mejora notoria en las propiedades electrocatalíticas que supone la utilización de electrodos híbridos grafeno oxidado/oro.

#### **4.1. Efecto del espesor de la película en la electrocatálisis.**

Asimismo, se evaluó la influencia del espesor de la película de Azure A en la cinética de transferencia electrónica, ya que este es un factor que influirá sobre la oxidación electrocatalítica de NADH. En la figura 82 se refleja el efecto que tiene el espesor de la película electroactiva en la eficiencia catalítica. A efectos comparativos se han incluido los datos relativos al electrodo de oro, en la figura se puede apreciar que al aumentar el número de ciclos se produce una disminución en la eficiencia catalítica en ambos electrodos, que se hace más evidente para el electrodo de oro híbrido. Al comparar ambos resultados se puede afirmar que la presencia de grafeno oxidado hace que la disminución en la eficiencia catalítica con el espesor de la película electroactiva sea más acusada, de forma que se produce una disminución de más del 50% al aumentar el número de ciclos de electroinjerto.

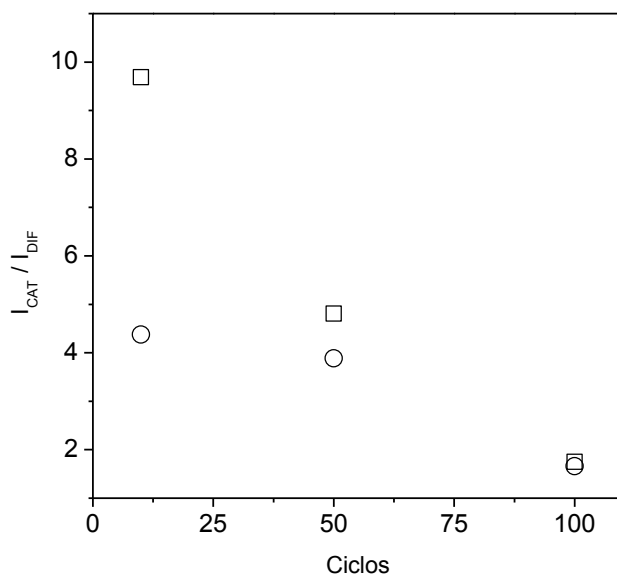


Fig. 82. Eficiencia catalítica de los electrodos de oro (círculos) y de oro modificado con grafeno oxidado (cuadrados) frente a la oxidación de NADH (1 mM) en función del número de ciclos aplicados en la etapa de electroinjerto de Azure A.

De los resultados obtenidos se desprende que la formación de películas delgadas de Azure A (thin films) sobre superficies de oro o de oro modificado con grafeno oxidado representa una ventaja en el diseño de sensores, tanto a efectos de la cinética de transferencia electrónica como a efectos de la catálisis en sí misma.

## 4.2. Estudio de la constante catalítica mediante el método de Galus.

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para los electrodos de oro, se ha calculado la constante catalítica del proceso de electrooxidación de NADH ( $K_{cat}$ ). De este modo, ha sido posible establecer una comparativa entre los valores obtenidos para ambos electrodos.

En la figura 83.A se muestra la representación de la eficiencia catalítica del electrodo híbrido respecto a la raíz cuadrada del tiempo para diferentes concentraciones de NADH. En la figura 83.B se representa la eficiencia catalítica normalizada con la raíz del tiempo frente a la concentración de NADH. De dicha representación se obtiene una línea recta de cuya pendiente se puede calcular la constante catalítica del proceso.

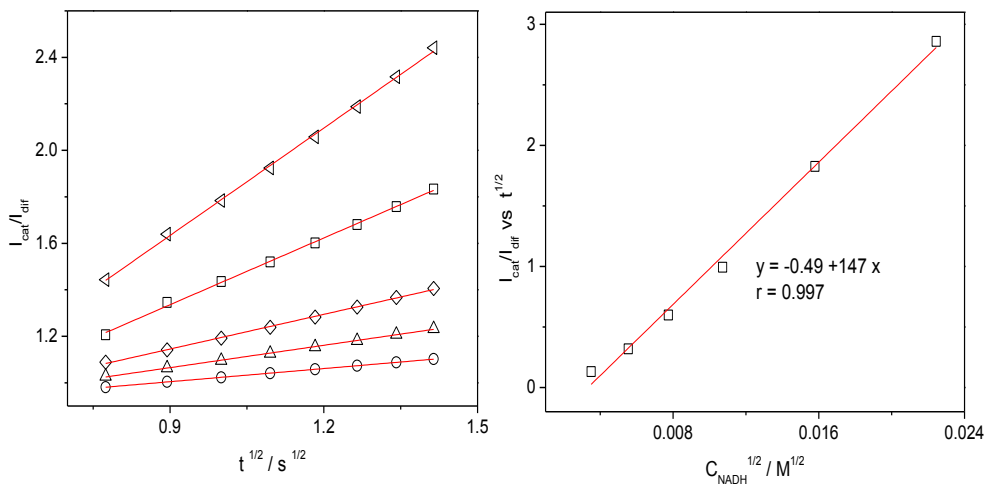


Fig. 83.A) Representación de la eficiencia catalítica respecto a la raíz cuadrada del tiempo. Fig. 83.B) Eficiencia catalítica normalizada con la raíz cuadrada del tiempo de muestreo respecto a la raíz de la concentración de NADH para los electrodos híbridos Au/GO.

El valor obtenido de la constante catalítica sobre electrodos híbridos GO/Au fue de  $6.8 \pm 0.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . Este valor es significativamente superior al obtenido sobre electrodos de oro ( $3.9 \pm 0.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y por tanto confirma la ventaja que supone la utilización de este novedoso nanomaterial en términos de catálisis de NADH.

### **4.3. Sensor de NADH: propiedades analíticas.**

Finalmente, se han evaluado las propiedades analíticas del sensor de NADH desarrollado. Para ello, mediante cronoamperometría de un pulso de potencial se obtuvieron las curvas de calibrado, bajo las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en el capítulo anterior. La medida de la intensidad de corriente debida a la oxidación del NADH, se registró en estado estacionario tras 100 segundos y el estudio se realizó con tres electrodos diferentes preparados de igual modo. En la figura 84.A se observa la respuesta cronoamperométrica del sensor de NADH. Mientras que, en la figura 84.B se muestra la curva de calibrado correspondiente al intervalo de concentraciones de 0.63 a 4.21  $\mu\text{M}$ , representándose la relación de la intensidad de corriente, promedio de tres determinaciones, normalizada con el recubrimiento en función de la concentración de NADH.

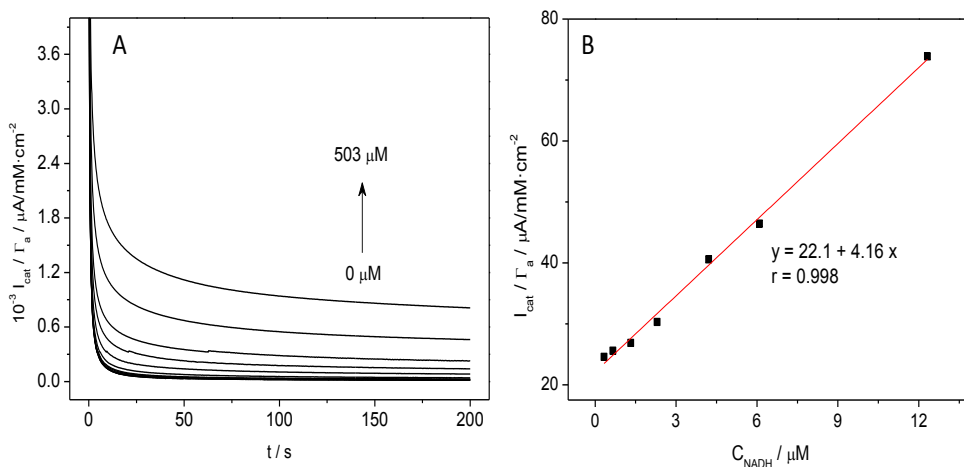


Fig. 84.A) Cronoamperogramas de la oxidación electroquímica de NADH sobre electrodos híbridos GO/Au modificados con Azure A. Fig. 84.B) Curva de calibrado promedio ( $n=3$ ) de la oxidación electroquímica de NADH sobre dichos electrodos modificados.

El límite de detección y determinación alcanzado con los electrodos híbridos grafeno oxidado/oro modificados con Azure A se calculó a partir del tramo lineal de la curva de calibrado, de manera análoga a la descrita en anteriores capítulos, obteniéndose valores de  $0.48 \pm 0.06 \mu\text{M}$  y  $1.61 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , respectivamente. Los resultados obtenidos son similares, aunque ligeramente inferiores al límite de detección y determinación correspondientes a los electrodos de oro modificados con Azure A descritos en el capítulo anterior. La reproducibilidad se evaluó siguiendo el mismo procedimiento que en capítulos anteriores, para una concentración de NADH de  $2.30 \mu\text{M}$ . El valor de la desviación estándar relativa (RSD) obtenido fue  $6.8 \%$ , inferior al coeficiente de variación de Horwitz ( $CV_H = 14$ ), lo cual es indicativo de la estabilidad de la respuesta analítica.

En la tabla 10 se resumen los parámetros analíticos obtenidos para el sensor descrito y se compara con otros dispositivos sensores

de NADH que utilizan nanomateriales como grafeno y grafeno oxidado descritos en la literatura.

Tabla 10. Características analíticas de los electrodos híbridos GO/Au modificados con Azure A para la determinación de NADH.

	Sensibilidad ( $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{M}$ )	Reproducibilidad (RSD %)	Límite de detección ( $\mu\text{M}$ )	Ref
RGO/GC	2.68	40 - 800	4.1	10	[89]
GO/CSPE	2.52	0.8 - 500	—	0.1	[103]
AuNRs-RGO/GC	10.27	5.0 - 377	3.7	6	[165]
AuNPs-RGO/CHIT-GC	0.318	1.5 - 320	—	1.2	[166]
AA/GO-Au	4.16	0.66 - 508	6.8	0.48	Este trabajo

RGO (Grafeno oxidado reducido), CSPE (Electrodo serigrafiado de carbono), AuNRs (Nanorods de oro), AuNPs (Nanopartículas de oro), CHIT (quitosano), AA (Azure A).

El límite de detección alcanzado se encuentra por debajo que el obtenido con electrodos modificados con grafeno reducido [95], incluso es menor que el obtenido con electrodos híbridos desarrollados gracias a la interacción entre nanopartículas de oro y grafeno, nanomateriales ambos con grandes propiedades electrocatalíticas [174, 175]. El límite de detección alcanzado es del mismo orden de magnitud que el obtenido con electrodos de carbono sobre los que se ha depositado grafeno oxidado; no obstante la sensibilidad del sensor desarrollado en el presente trabajo es ligeramente superior, además de lograr una reducción adicional de 200 mV en el potencial de pico [109]. Como puede observarse, las propiedades analíticas del sensor desarrollado son la más favorables comparadas con las de otros sensores similares descritos en la bibliografía.

Los resultados obtenidos confirman que el electrodo híbrido desarrollado posee las propiedades analíticas requeridas para llevar a cabo la determinación cuantitativa de NADH.

Se puede concluir, por tanto, que se ha logrado desarrollar con acierto un electrodo híbrido mediante la incorporación de un nanomaterial como el grafeno oxidado a un electrodo de oro. El dispositivo obtenido ha sido caracterizado exhaustivamente mediante diversas técnicas instrumentales. Asimismo, se ha estudiado el procedimiento de electroinjerto de Azure A sobre el electrodo híbrido obtenido, lo que ha permitido finalmente desarrollar un sensor que puede ser utilizado en la determinación analítica de NADH.





# CAPÍTULO VI

---

## DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE ETANOL



En los anteriores capítulos de esta memoria se han descrito la preparación y caracterización de varios sensores electroquímicos de NADH. La oxidación electroquímica de NADH a bajos potenciales presenta un gran interés, puesto que más de 300 enzimas deshidrogenasas requieren su presencia como cofactor. Por ello, los dispositivos electroquímicos que puedan llevar a cabo dicha oxidación, pueden ser utilizados como plataformas para el desarrollo de biosensores basados en enzimas deshidrogenasas. Por tanto, el objetivo principal de este capítulo ha sido el desarrollo de un biosensor de etanol utilizando para ello el sensor de NADH que presente mayor eficiencia catalítica de los descritos, en combinación con la enzima alcohol deshidrogenasa.

En primer lugar se llevó a cabo una comparativa, en términos de eficiencia catalítica frente a la oxidación de NADH, entre los tres tipos de sensores de NADH desarrollados: de carbono, de oro y de grafeno oxidado-oro. En la figura 85, se puede apreciar que los electrodos serigrafiados de carbono son los transductores electroquímicos que presentan una mayor respuesta catalítica (17.2), comparados con los electrodos de oro modificados con grafeno oxidado (10.0) y con los electrodos de oro (4.33).

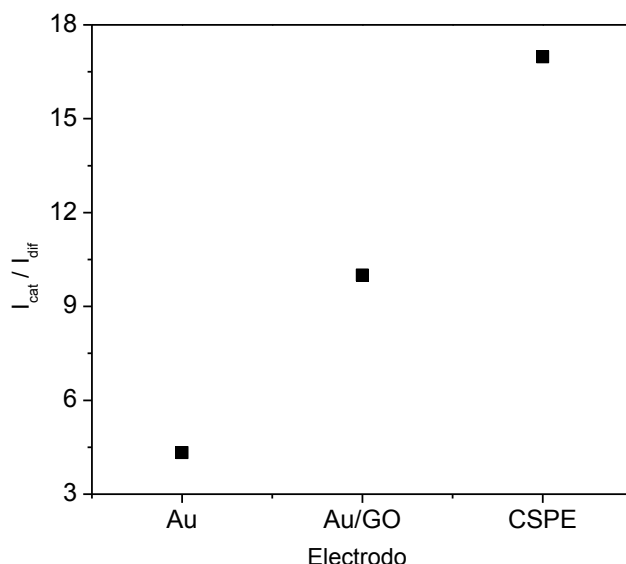


Fig. 85. Eficiencia catalítica del sensor de NADH en función de la naturaleza del transductor utilizado. Respuesta de los electrodos modificados con una concentración de Azure A de 5 mM y 10 ciclos de electroinjerto frente a la oxidación de NADH 1 mM en tampón fosfato pH 7 (0.1 M).

Consecuentemente, se ha optado por llevar a cabo el desarrollo del dispositivo biosensor con los electrodos serigrafiados de carbono. Este electrodo serigrafiado, que es una celda electroquímica en sí misma, presenta además una serie de ventajas como la posibilidad de trabajar con microvolúmenes de muestra, lo que disminuye el consumo de reactivos; la portabilidad, que permitiría realizar un análisis *in situ* (análisis point of care), es desechable y de bajo coste.

En la fabricación del dispositivo biosensor se ha utilizado la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) proveniente de la levadura de cerveza (*Saccharomyces Cerevisiae*). Esta enzima, como se ha descrito en la introducción, cataliza la transformación de alcohol a acetaldehído en presencia del cofactor ( $NAD^+$ ) generando NADH,

según la reacción descrita en la figura 86. El NADH generado enzimáticamente puede ser cuantificado mediante el electrodo modificado mediante electroinjerto de Azure A.

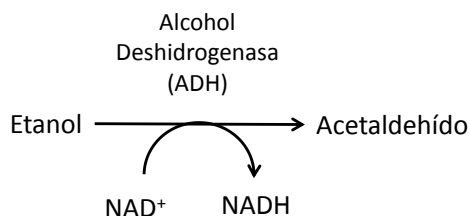


Fig. 86. Reacción de oxidación de etanol mediada por la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) dependiente de NAD<sup>+</sup>.

La enzima ADH presenta una gran actividad frente a la oxidación de alcoholes alifáticos, disminuyendo su actividad enzimática al incrementarse la longitud de la cadena del alcohol. El sustrato por el que presenta una mayor afinidad es el etanol, para el que se ha reportado una constante de Michaelis ( $K_M$ ) de 2.1 mM [176].

### **1. Estudio de la inmovilización de la enzima ADH sobre el sensor de NADH.**

En primer lugar, para fabricar el dispositivo biosensor, se llevó a cabo la modificación de la superficie del electrodo mediante electroinjerto de Azure A según las condiciones previamente optimizadas. Como se ha apuntado anteriormente en la introducción, la película de Azure A resultante puede actuar, además de como superficie electrocatalítica, como un adhesivo biomolecular. Por tanto, en una primera aproximación, la enzima se depositó directamente sobre la superficie del electrodo modificado y se dejó

secar, siguiendo la metodología detallada en el procedimiento experimental. Con el fin de evaluar la influencia del tiempo de inmovilización, se ensayaron tiempos de inmovilización de 2 y 24 h. En la figura 87.A y 87.B se muestra la respuesta de los biosensores desarrollados, respectivamente. Se puede observar que la respuesta del biosensor aumenta tras la primera adición de etanol (1.0 M) en ambos casos. Sin embargo, tras sucesivas adiciones de etanol se produce una pérdida en la respuesta biocatalítica, que puede estar motivada por la pérdida de la enzima de la superficie electródica, o por una inhibición por sustrato debida a una mala conexión entre la enzima y la película electrocatalítica.

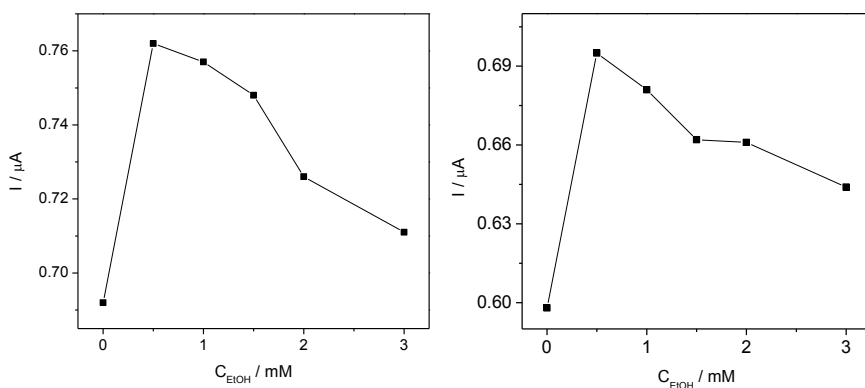


Fig. 87. A) y B) Representación de la respuesta biocatalítica de dos electrodos serigrafiados de carbono (CSPE) modificados con Azure A tras la incubación con ADH durante 2 y 24h tras la adición de cantidades crecientes de etanol (0.5 – 3 mM) en tampón fosfato pH 8.0 (0.1M) para una velocidad de barrido de 10 mVs<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos sugieren que la utilización de la película electroinjetada de Azure A como adhesivo biomolecular en la inmovilización directa de la enzima no logra su finalidad. Por ello, con el objetivo de evitar la pérdida de respuesta del biosensor se hace necesario modificar el procedimiento de inmovilización.

## **2. Incorporación de nanopartículas de oro (AuNPs) en la construcción del biosensor de ADH.**

Como se ha descrito en la introducción de esta memoria, la incorporación de nanomateriales en el diseño y fabricación de biosensores puede mejorar sustancialmente las propiedades del dispositivo en términos de transferencia electrónica entre biomolécula y superficie electródica, eficiencia puesto que permite incorporar más enzima por unidad de área, y estabilidad. En la construcción de dispositivos biosensores estos beneficios se traducen en un aumento en la respuesta biocatalítica y, consecuentemente, en una mejora de las propiedades analíticas del biosensor, logrando por ejemplo un aumento del intervalo de respuesta lineal, así como una significativa reducción de los límites de detección y cuantificación [177].

De entre los nanomateriales disponibles, las nanopartículas de oro presentan la ventaja de su biocompatibilidad, su capacidad de funcionalización con distintos grupos funcionales, y sus grandes propiedades electrocatalíticas. En este sentido, en el presente trabajo se ensayó la incorporación de este nanomaterial en el desarrollo del biosensor de etanol. En la gran mayoría de los trabajos reportados que utilizan nanopartículas metálicas, éstas se utilizaron con el fin de optimizar la transferencia electrónica entre el electrodo y la enzima, como pequeños centros conductores. No obstante, una segunda estrategia consiste en utilizarlas no solo para mejorar la transferencia de carga, sino para orientar el centro activo de la enzima. Para este propósito, las nanopartículas de oro deben funcionalizarse con grupos activos coordinantes que sean capaces de unirse a los átomos metálicos presentes en el centro activo de la enzima. Si además estas nanopartículas metálicas tienen el tamaño adecuado pueden introducirse en él, con la finalidad de que su función

coordinante/orientadora o como centro de transferencia electrónica sea mayor. En el trabajo desarrollado, se ha recurrido a esta última estrategia para mejorar la respuesta del biosensor.

La enzima alcohol deshidrogenasa requiere de la presencia de dos sustratos en el centro activo para desarrollar su actividad enzimática, etanol y  $\text{NAD}^+$ . El centro activo de la enzima presenta dos dominios diferenciados, un dominio mayor donde se acomoda el coenzima y el sustrato, y un dominio catalítico, de menor tamaño, donde se encuentra el átomo de zinc. Cuando el complejo enzima- $\text{NAD}^+$ -alcóxido está formado, se produce la transferencia de un ion hidruro, reduciéndose el coenzima y liberándose  $\text{NADH}$ .

Con el fin de coordinar las nanopartículas a los átomos de zinc, estas se modifican con dos reactivos bifuncionales que presentan grupos tiol por los que se unirán a las nanopartículas y grupos quelatantes del zinc, en particular alcóxidos o carboxilatos expuestos hacia la superficie (Fig. 88). De este modo, los reactivos utilizados para la modificación de las nanopartículas fueron ácido tióctico y mercaptohexanol.

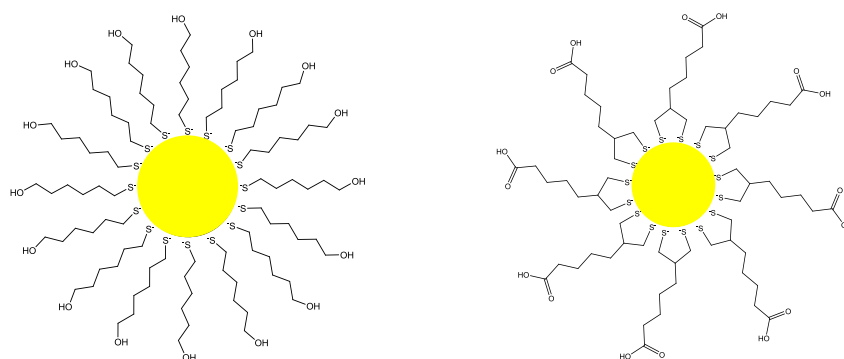


Figura 88. Esquema de las nanopartículas de oro sintetizadas, modificadas con 6-mercaptohexanol (izquierda) y ácido tióctico (derecha).



Dado que el objetivo es introducir las nanopartículas modificadas en el dominio catalítico de la enzima, se prepararon nanopartículas modificadas mediante el método de Brust-Schiffrin, que presentan un tamaño de unos pocos nanómetros. En una primera aproximación, se iniciaron los estudios con las nanopartículas recubiertas de ácido tióctico (TOA-AuNPs), con las que se llevaron a cabo los estudios de optimización de las condiciones experimentales y posteriormente se realizó la síntesis de nanopartículas de oro recubiertas de mercaptohexanol (MCH-AuNPs), puesto que se consideró que gracias a la mayor longitud de su cadena alifática podría interaccionar más fuertemente con el centro activo de la enzima y de este modo, generar una mayor respuesta biocatalítica

### **2.1. Caracterización del tamaño de las nanopartículas de oro (AuNPs).**

En primer lugar, se llevó a cabo la estimación del tamaño de las nanopartículas sintetizadas recubiertas con ácido tióctico (TOA-AuNPs). En la imagen 89.A, se muestra una imagen TEM de un área de la rejilla densamente poblada con nanopartículas. El cálculo del diámetro de las nanopartículas se realizó mediante el software de análisis de imágenes Gwyddion para una población de 75 nanopartículas, la cual se considera representativa del conjunto de la muestra. Con los datos obtenidos se generó un histograma de frecuencias como el que se muestra en la figura 89.B, se puede observar que la gran mayoría de las nanopartículas presenta un diámetro que oscila entre los 3 y 4 nm, siendo el valor promedio de estas 3.4 nm. La distribución presenta una elevada monodispersidad, dado que aproximadamente el 50% de la población total de nanopartículas pertenece a dicho intervalo.

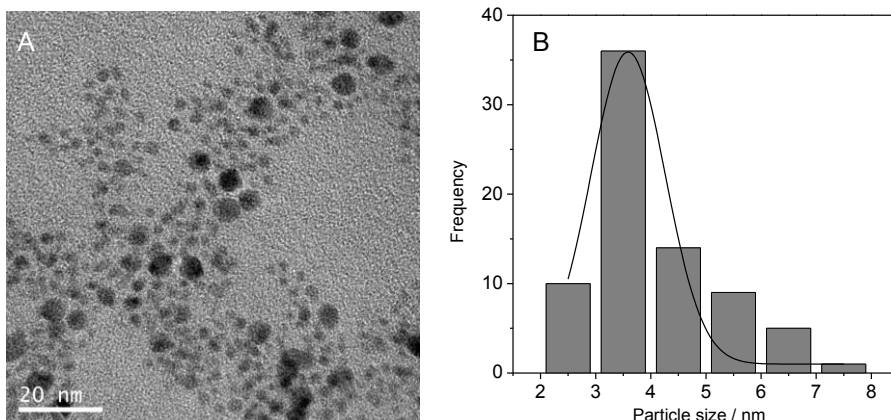


Fig. 89.A) Imagen STEM de una población de nanopartículas TOA-AuNPs sintetizada mediante el método de Brust-Schiffrin. Fig. 89.B) Histograma de frecuencias relativo al diámetro de las nanopartículas obtenidas en la imagen A.

Los resultados obtenidos demuestran que las nanopartículas sintetizadas mediante el método Brust-Schiffrin [178] presentan un diámetro menor que las sintetizadas mediante métodos de reducción por citrato. Gracias a esto pueden quedar incluidas dentro de la enzima sin desnaturalizar la estructura proteica, evitando la consecuente pérdida de actividad.

Para comprobar que realmente las nanopartículas sintetizadas pueden incluirse en el centro activo de la enzima donde se encuentra el zinc, se realizaron estudios mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), según el procedimiento descrito en el capítulo de materiales y métodos. Para ello, se modificó la enzima ADH con nanopartículas recubiertas de ácido tióctico y se depositó sobre una rejilla de microscopía TEM, obteniéndose posteriormente imágenes mediante HAADF-TEM. En la figura 90.A se muestra una imagen HAADF-TEM de la enzima modificada con nanopartículas de oro, se observa por los puntos que pueblan la imagen que estas se han incorporado dentro de la estructura proteica. En la gráfica 90.B se

muestra el espectro EDX correspondiente al área circular señalada en la imagen 70.A, en él se observan los picos de rayos X característicos del oro, lo que confirma la presencia de las nanopartículas en el interior de la enzima. Las figuras 90.C y 90.D se corresponden con la distribución mediante EDX del área encuadrada en la imagen 90.A para las radiaciones características del oro y del zinc respectivamente. El área de mayor densidad de nanopartículas se corresponde aproximadamente con la distribución de los átomos de zinc en la enzima.

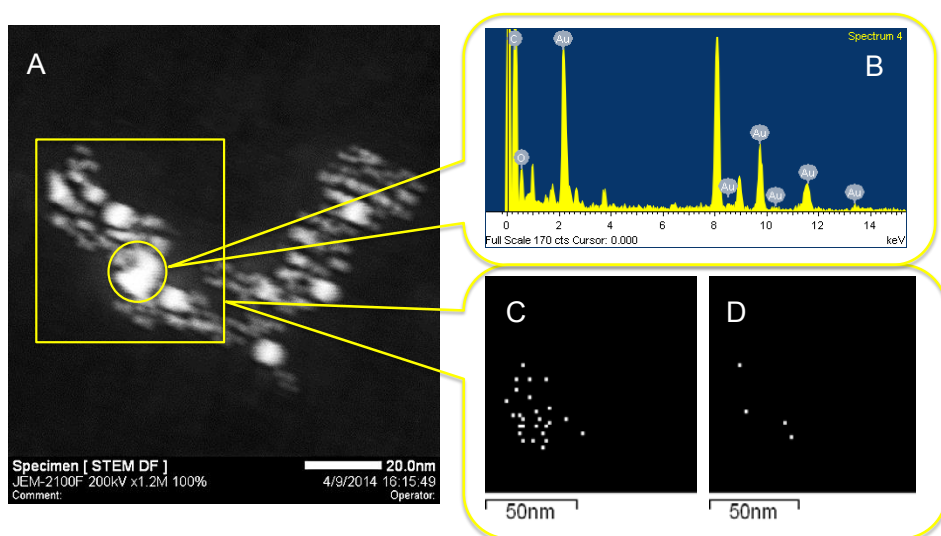


Fig. 90.A) Imagen HAADF-STEM de la enzima ADH depositada en una rejilla de TEM tras ser incubada con nanopartículas TOA-AuNPs. Fig. 90.B) Espectro EDX del área circular correspondiente a la figura A. Fig. 90.C) y D) Espectro EDX elemental del oro y zinc, respectivamente correspondiente al área recuadrada de la figura A.

El análisis por TEM demuestra que las nanopartículas TOA-AuNPs se incorporan a la estructura enzimática gracias a su pequeño tamaño y a la presencia de un agente complejante del átomo de zinc, lo que puede ser útil para incrementar la tasa de transferencia electrónica entre la enzima y la superficie del electrodo cuando se utilizan las nanopartículas como elemento conector.

## **2.2. Cálculo de la concentración de nanopartículas mediante TXRF.**

Debido al pequeño tamaño de las nanopartículas sintetizadas (3-4 nm), estas no presentan resonancia de plasmón superficial y, por tanto, no puede evaluarse su concentración mediante métodos espectrofotométricos [179]. En este sentido, para llevar a cabo una estimación de la concentración de nanopartículas es necesario utilizar una técnica instrumental que nos aporte información cuantitativa acerca de la cantidad de oro elemental de la muestra. La Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF) es una técnica microanalítica que mediante el estudio de las emisiones de fluorescencia de rayos X de los elementos constituyentes de una muestra tras ser excitados mediante una fuente de rayos X, permite extraer información tanto cualitativa como cuantitativa, ya que la emisión de fotones de rayos X secundarios es característica de cada uno de los elementos químicos presentes en la muestra [180]. El resultado es un espectro de dispersión de energía donde aparecen todas las transiciones asociadas a los elementos químicos presentes. Por tanto, es posible cuantificar la cantidad de un elemento presente, en relación a un patrón de concentración conocida.

El valor obtenido para la cantidad de oro coloidal presente en la disolución de nanopartículas sintetizadas fue de 1032 ppm. Si el radio promedio de una nanopartícula es de aproximadamente 1.7 nm, el área superficial calculada para dicha nanopartícula es de 36.32 nm<sup>2</sup> y por tanto la concentración de nanopartículas en la muestra es de 2.1 µM.

### 2.3. Respuesta del biosensor ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE.

Con el objetivo de aprovechar las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de oro (TOA-AuNPs), se desarrolló un biosensor siguiendo el mismo esquema que el utilizado anteriormente. Una vez diseñado el biosensor, se estudió su respuesta en presencia de etanol. Para ello se realizó el estudio mediante voltamperometría cíclica del biosensor ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE bajo las mismas condiciones que el experimento descrito anteriormente para el biosensor sin nanopartículas de oro (Fig. 87). En la figura 91 se esquematizan las reacciones enzimáticas que tienen lugar en el biosensor desarrollado.

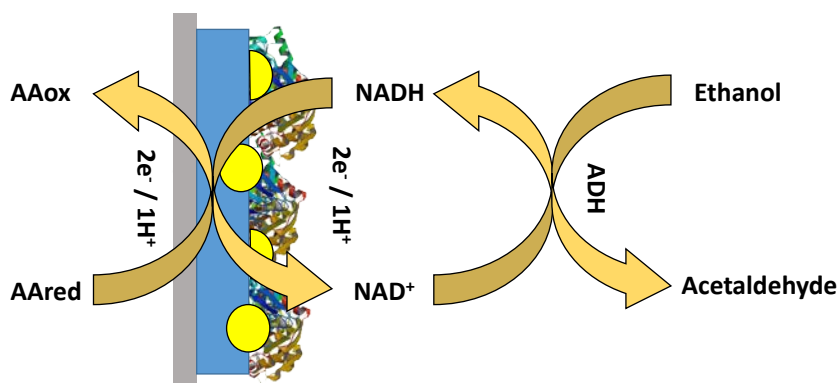


Fig. 91. Esquema de las reacciones que se producen en el biosensor ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE.

En la figura 92 se recoge la respuesta ciclovoltamperométrica del biosensor modificado con nanopartículas de oro (ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE). Se puede observar que tal como ocurría en ausencia de nanopartículas, la adición de etanol provoca un aumento de la intensidad de corriente catalítica causado por la oxidación del NADH generado enzimáticamente sobre la película de Azure A. Pero en este caso la corriente catalítica es muy superior a la obtenida sin

nanopartículas. Sin embargo, al igual que anteriormente, sucesivas adiciones de etanol no conlleva un aumento continuado de dicha corriente catalítica.

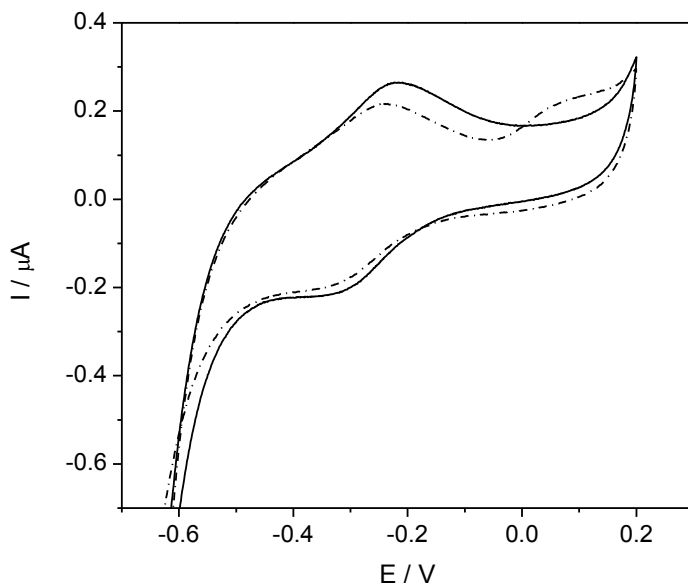


Fig. 92. Voltamperogramas cíclicos de un biosensor ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de una disolución tampón fosfato pH 8.0 (0.1M) y  $\text{NAD}^+$  1 mM tras la adición de una concentración de etanol 1 mM. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mVs}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos parecen indicar que se produce una pérdida de la proteína de la superficie del electrodo modificado. Por tanto, consideramos necesario variar la metodología de inmovilización de la ADH para conseguir un resultado satisfactorio. Así, se optó por además de coordinar la enzima a las nanopartículas, atraparla en una matriz polimérica capaz de retenerla sobre la superficie electródica.

### **3. Recubrimiento polimérico de la superficie biosensora.**

El atrapamiento físico en matrices poliméricas ha sido una de las estrategias implementadas para llevar a cabo la inmovilización de enzimas sobre electrodos. Sin embargo, una de las principales problemáticas derivadas de dicha inmovilización cuando se utilizan polímeros de atrapamiento está causada por la pérdida de actividad enzimática. Cuando se producen interacciones de tipo electrostático entre los grupos funcionales del polímero y los residuos peptídicos presentes en la enzima, que modifican irreversiblemente la estructura de ésta última, se produce la pérdida de la actividad y por tanto la ineficacia del dispositivo. Por ello, en la fabricación del biosensor, se han ensayado diferentes polímeros utilizados comúnmente en la inmovilización de enzimas, tanto catiónicos como la polietilénimina (PEI), aniónicos como el nafion ó neutros como polietilenglicol (PEG).

De entre los polímeros ensayados, el que ha resultado más adecuado como medio de inmovilización ha sido el quitosano. Constituido por la polimerización de la quitina bajo condiciones de deacetilación controlada presenta, adicionalmente, una serie de ventajas como la baja densidad, la biocompatibilidad, la inocuidad, así como la existencia de una estructura porosa que facilita la difusión de sustancias a través del polímero [181].

La función del quitosano es retener la enzima en la superficie del electrodo modificado con el mediador Azure A. Para confirmar si, efectivamente, el polímero ejerce dicha función, se evaluó si la respuesta electrocatalítica obtenida se debe exclusivamente al NADH generado en la reacción enzimática que se produce sobre la superficie electródica y no a moléculas de enzima que hayan podido desprenderse de la capa biosensora y permanezcan en la disolución de la celda electroquímica. Para ello un electrodo modificado,

siguiendo el procedimiento descrito en el apartado experimental, y recubierto con el polímero quitosano (CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE), se sumergió en una celda electroquímica que contenía 1.0 mM de  $\text{NAD}^+$  y 3.0 mM de etanol en PBS pH 8.0 y se registró su respuesta mediante voltamperometría cíclica, observándose la corriente catalítica descrita en la figura 92. Una vez finalizada la medida, una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  proveniente de la celda se diluyó convenientemente (1:10) y se trasladó a la cubeta del espectrofotómetro con el fin de analizar el NADH generado enzimáticamente. En la figura 8 se muestra el espectro ultravioleta-visible de la alícuota proveniente de la celda electroquímica (línea discontinua), en él se aprecia una banda a 340 nm que se corresponde con la absorción del NADH generado en el ensayo ciclo voltamperométrico. Como se puede observar en la gráfica, la adición de cantidades crecientes de etanol a la celda del espectrofotómetro no origina un aumento en la intensidad de la banda correspondiente al NADH. Por consiguiente, se puede concluir que la enzima no se encuentra presente en la celda del espectrofotómetro, sino que ha quedado retenida en la superficie del biosensor.



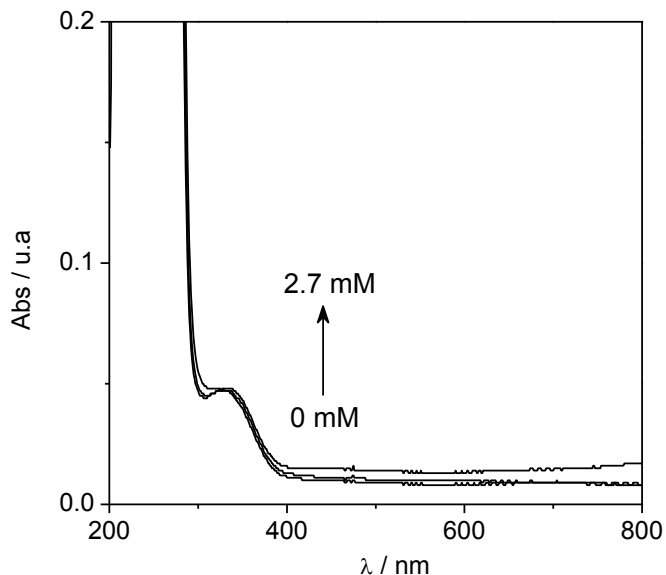


Fig. 93. Espectros UV-Vis de una alícuota de la disolución de la celda electroquímica que contenía el biosensor preparado cuando se ha aplicado un recubrimiento polimérico tras adiciones sucesivas de etanol.

Por otra parte, en la figura 94 se muestra el estudio análogo al descrito con anterioridad, cuando no se ha recubierto la superficie del biosensor con el biopolímero quitosano. Se puede apreciar que la banda de absorción correspondiente al NADH generado en el ensayo ciclovoltamperométrico presenta una intensidad de absorción similar al de la figura 93. Este hecho es indicativo de que a través del recubrimiento polimérico se establece la difusión de las especies que participan en la reacción enzimática en ambos sentidos. Sin embargo, en este caso al realizar adiciones sucesivas de etanol a la celda espectrofotométrica (línea continua) se observa un aumento en la intensidad de la banda de absorción correspondiente al NADH, lo que indica que la enzima se encuentra presente en la celda espectrofotométrica y en presencia de cofactor y cantidades crecientes de sustrato (etanol) genera NADH de acuerdo con la

reacción enzimática (figura 86). Por tanto, este ensayo confirma que en ausencia de quitosano la enzima ADH se desprende de la capa biosensora pasando a la disolución.

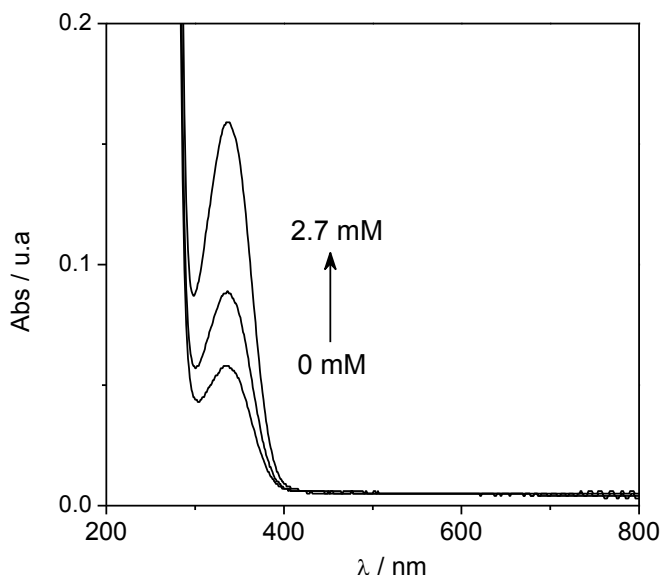


Fig. 94. Espectros UV-Vis de la alícuota recogida del estudio electroquímico del biosensor preparado en ausencia de recubrimiento polimérico (línea discontinua) tras la realización de adiciones de etanol a la celda espectrofotométrica (línea continua).

Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis planteada en el apartado anterior, donde se postulaba que la pérdida de la actividad enzimática se producía por el desprendimiento de la enzima de la capa biosensora. Se puede concluir, por tanto, que para retener la enzima sobre la superficie biosensora es necesario aplicar un recubrimiento polimérico, como el quitosano.

### **3.1. Respuesta del biosensor preparado con el recubrimiento polimérico.**

Se llevó a cabo la caracterización de la respuesta del dispositivo mediante voltametría diferencial de pulsos (DPV) con el fin de mejorar la sensibilidad del dispositivo. En esta técnica electroquímica la corriente se muestrea inmediatamente antes de la aplicación del pulso y al final del periodo de aplicación de este, representándose la diferencia entre ambos valores. De este modo se consigue mejorar la relación entre corriente faradaica y corriente de carga, de modo que se logra una mejora significativa en la sensibilidad.

En la figura 95 se muestra la respuesta del biosensor de etanol como la relación de intensidad catalítica ( $I_{cat}$ ) normalizada con la respuesta del biosensor en ausencia de etanol ( $I_o$ ) para un electrodo modificado con nanopartículas de oro y quitosano CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE (rombos) y un biosensor control preparado sin nanopartículas CHIT/ADH/AA/CSPE (triángulos). La incorporación de las nanopartículas de oro conduce a un aumento en la respuesta del biosensor. Ésta, además, presenta el comportamiento característico de una catálisis enzimática. No obstante, el efecto más significativo es la mayor estabilidad de la respuesta al utilizar las nanopartículas como plataforma de inmovilización de la enzima. El biosensor construido en ausencia de éstas muestra una disminución de su respuesta al aumentar la concentración de etanol, probablemente debido a la pérdida de la actividad enzimática. Este comportamiento tal como se apuntó anteriormente puede estar motivado por la inadecuada orientación de la enzima sobre la superficie del electrodo.

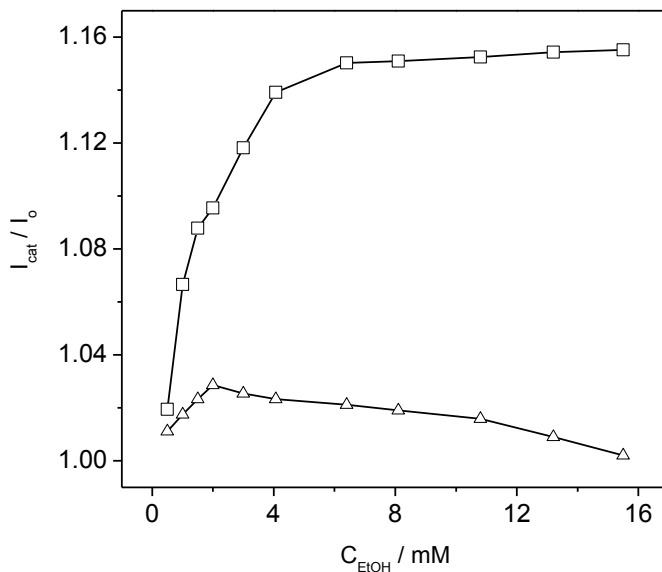


Fig. 95. Respuesta de los biosensor de etanol CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE (rombos) CHIT/ADH/AA/CSPE (triangulos) en función de la concentración de etanol añadida. Carga enzimática (10 U), concentración de nanopartículas: 0.47  $\mu\text{M}$  en presencia de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0.

Los resultados obtenidos indican que el biosensor preparado mediante la incorporación de nanopartículas de oro modificadas TOA-AuNPs muestra una gran respuesta catalítica frente a la oxidación de etanol, cuando el NADH generado enzimáticamente puede ser cuantificado gracias a la película electroinjetada de Azure A.

#### 4. Estudio cinético de la reacción enzimática.

Como se ha descrito en el capítulo de introducción, la práctica totalidad de las reacciones mediadas por enzimas se ajustan al modelo cinético propuesto por Michaelis y Menten en 1913. Considerando que la concentración de enzima se mantiene constante, este modelo postula que la velocidad de la reacción enzimática se puede calcular mediante la siguiente ecuación, denominada ecuación de Michaelis-Menten (18).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (18)$$

En el desarrollo de biosensores enzimáticos para optimizar su funcionamiento es importante conocer los parámetros cinéticos que describen dicha reacción, en particular la constante de Michaelis ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ). En este caso concreto, donde la reacción enzimática se da en dos pasos y la etapa determinante de la reacción enzimática es la disociación del producto NADH-enzima [182], la constante de Michaelis ( $K_M$ ) representa la afinidad de la enzima por el sustrato. Por otro lado, la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) refleja la velocidad cuando la totalidad del sustrato se ha unido a la enzima, alcanzándose condiciones de saturación. Estos parámetros influyen en parámetros analíticos tales como la sensibilidad y el intervalo lineal.

También se comprobó que la respuesta del biosensor se debe exclusivamente a la reacción mediada por el enzima y no a la oxidación directa del analito (etanol) sobre la superficie de las nanopartículas. Para ello se realizaron las medidas con el biosensor y con el electrodo preparado de la misma forma, pero sin enzima. En la figura 96, se muestra la representación de la intensidad de corriente catalítica ( $I_{cat}$ ) normalizada con la respuesta del biosensor en ausencia de etanol ( $I_0$ ) del electrodo CHIT/ADH/TOA-

AuNPs/AA/CSPE (cuadrados) comparado con un electrodo modificado en ausencia de enzima CHIT/TOA-AuNPs/AA/CSPE (triángulos) frente a la adición de cantidades crecientes de etanol en el intervalo de concentraciones de 0.5 mM a 15.6 mM. Como era de esperar, en ausencia de enzima no se evidencia ningún tipo de respuesta biocatalítica.

Por otra parte, la respuesta del biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE muestra el comportamiento característico de cinéticas de tipo michaeliano. En la figura se observa que a concentraciones bajas de etanol, la respuesta del biosensor varía linealmente con la concentración, en este intervalo se produce la formación del complejo enzima-sustrato y la cinética es de primer orden. Conforme se incrementa la concentración de etanol, disminuyen las posiciones activas de la enzima y la relación intensidad de corriente-concentración deja de ser lineal. Cuando virtualmente toda la enzima se encuentra en forma de complejo enzima-sustrato, y no queda enzima libre, la adición de nuevas cantidades de etanol no supone un aumento de la intensidad de corriente de la reacción. En este punto se ha alcanzado la respuesta máxima del biosensor, donde la intensidad de corriente máxima ( $I_{\max}$ ) alcanza un valor constante e independiente de la concentración de sustrato (cinética de orden cero).

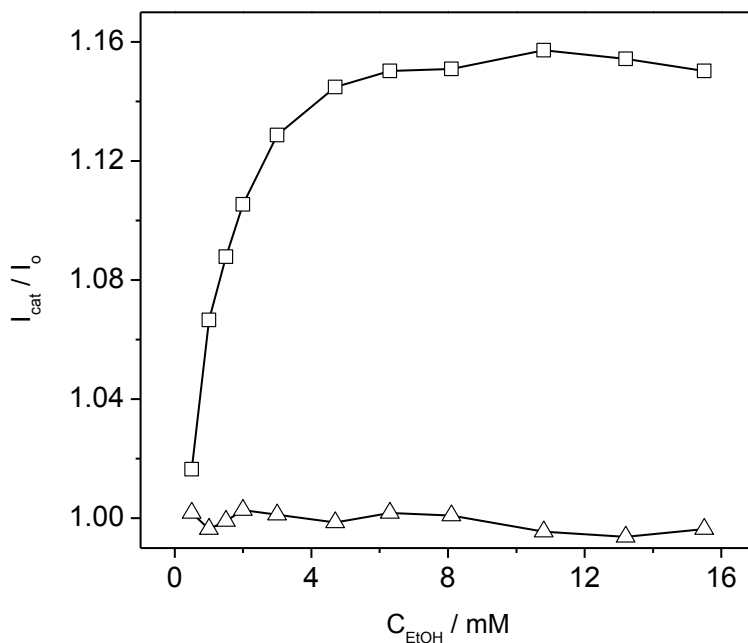


Fig. 96. Respuesta del biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE (cuadrados) y de un control en ausencia de enzima CHIT/TOA-AuNPs/AA/CSPE (triángulos) con la concentración de etanol (0 - 15.5 mM). Carga de enzima: 10 U, concentración de TOA-AuNPs de  $0.47 \mu\text{M}$  y de  $\text{NAD}^+$  de 1 mM en tampón fosfato pH 8 (0.1M).

Con el objeto de confirmar que el comportamiento cinético se ajusta a dicho modelo, diversos autores se han apoyado en el análisis de la ecuación de Hill (19). El coeficiente de Hill, parámetro  $x$  de la ecuación, actúa como indicador del grado de desviación de cinéticas de tipo michaeliano [183]. Cuanto mayor sea la desviación de éste respecto a la unidad, la cinética enzimática presentará un comportamiento más alejado del modelo propuesto por Michaelis-Menten.

$$\log\left(\left(\frac{i_{max}}{i}\right) - 1\right) = \log K'_m - x \cdot \log C_{EtOH} \quad (19)$$

En la figura 97 se muestra la representación de  $\log [(i_{\max}/i)-1]$  frente a  $\log C_{\text{EtOH}}$ . De la pendiente de la recta obtenida, cambiada de signo, se obtiene el valor del coeficiente de Hill ( $x$ ).

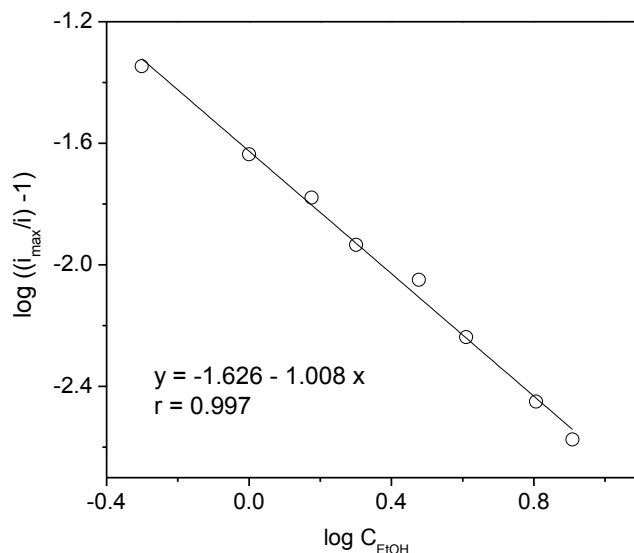


Fig. 97. Representación de la ecuación de Hill para el biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE en las condiciones anteriormente descritas.

El valor del coeficiente de Hill calculado de la pendiente de la recta es de 1.008. Este valor se aproxima mucho al valor teórico ( $x=1$ ) asociado a cinéticas enzimáticas que se ajustan el modelo de Michaelis-Menten.

Una vez se ha establecido la validez del modelo cinético, se lleva a cabo el cálculo de los parámetros que describen la cinética enzimática,  $K_M$  e  $I_{\max}$ . Para ello, como se observa en la figura 98, se realizó la representación de dobles recíprocos establecida por Lineweaver-Burk [184], donde se representa la inversa de la intensidad de corriente normalizada frente a la inversa de la concentración de etanol, obteniéndose una línea recta. El corte con



el eje de ordenadas proporciona la inversa de la velocidad máxima ( $1/I_{\max}$ ), mientras que el punto de corte con el eje de abscisas representa el cociente entre la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima ( $K_M/I_{\max}$ ), cambiada de signo.

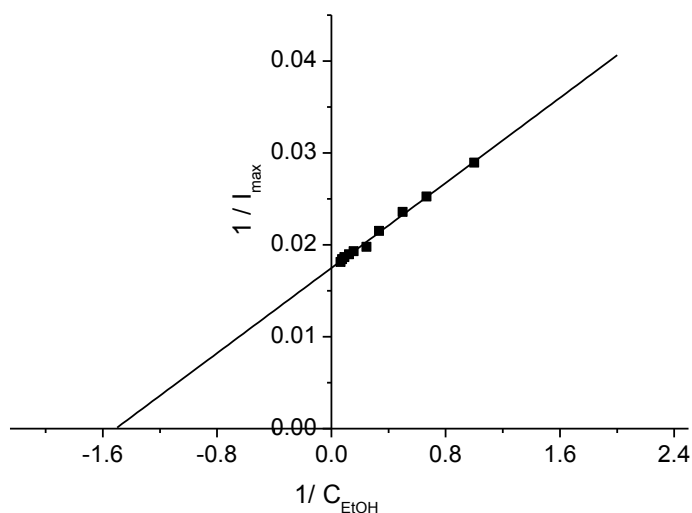


Fig. 98. Representación de Lineweaver-Burk del biosensor de ADH: CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE.

Los valores de  $K_M$  e  $I_{\max}$  obtenidos de la representación de Lineweaver-Burk son 0.63 mM y 1.20  $\mu\text{A}$ , respectivamente. En la tabla 11 se comparan los valores obtenidos en el presente trabajo con otros reportados en la bibliografía para biosensores de etanol basados en ADH donde se utilizan mediadores redox análogos al Azure A. Así, por ejemplo, la electropolimerización de dos fenoxazinas como el Azul Nilo [185] o el Azul de Cresil [186], en presencia de nanotubos de carbono se ha utilizado como método de inmovilización de la enzima ADH sobre electrodos de carbono obteniendo valores de  $K_M$  superiores a los de su forma libre ( $K_M$  Etanol = 2.1 mM). Otros

métodos de inmovilización, como la inclusión del mediador Azul de Toluidina y la enzima en un electrodo de pasta de carbono [187], o la preparación de una matriz sol-gel donde se incluya el mediador, en este caso Azul de Meldola [188], aumentan la afinidad de la enzima por el sustrato. No obstante, los mejores resultados se obtienen cuando el mediador se electroinjerta directamente sobre la superficie electródica. Ejemplos significativos de este incremento de la afinidad enzima-sustrato son el trabajo descrito por el profesor Nasri y colaboradores, donde un electrodo de carbono se modifica mediante electroinjerto de Azul de Toluidina al que posteriormente se le añade la enzima ADH [81], o el desarrollado en el presente trabajo, donde el valor de la constante de Michaelis ( $K_M$ ) obtenido es significativamente inferior a los recogidos en la tabla.

Tabla 11. Valores de la constante de Michaelis ( $K_M$ ) reportados en la bibliografía actual comparados al obtenido en el presente trabajo.

Biosensor	$K_M$ (mM)	Ref
ADH/PNB/SWNT/GC	6.3	[176]
ADH/PBCB/SWNT/GC	2.3	[177]
ADH/TBO-PCE	2	[178]
ADH/MB-Naf-MWCNT/TiO <sub>2</sub> Sol/GC	1.24	[179]
ADH/TBO/GC	0.91	[75]
Chit/ADH/AuNPs/AA/CSPE	0.63	<i>Presente trabajo</i>

PNB (Poli-Azul Nilo), PBCB (Poli-Azul de Cresil Brillante), SWCNT y MWCNT (Nanotubo de carbono pared simple y multiple, respectivamente), TBO (Azul de Toluidina), PCE (Electrodo de pasta de carbono), MB (Azul de Metileno), Naf (Nafion).

Este resultado demuestra que el biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE presenta una extraordinaria afinidad por el sustrato y por tanto resulta idóneo en el desarrollo de dispositivos biosensores de etanol.

## **5. Optimización de la respuesta del biosensor.**

### **5.1.Optimización de la carga de enzima.**

En el marco de la investigación científica, las enzimas son compuestos que presentan un coste relativamente elevado. Cuando se pretende establecer una transferencia de conocimiento a la industria, el coste por unidad se convierte en uno de los principales factores que dificulta la implantación del dispositivo tecnológico en el mercado. En este sentido, es importante diseñar dispositivos biosensores que presenten las mayores eficiencias catalíticas con la utilización de la menor cantidad de enzima posible.

La optimización de la carga de enzima del dispositivo, se llevó a cabo mediante la preparación de una serie de cuatro biosensores con diferentes cantidades de enzima ADH: 5, 10, 25 y 45 unidades de enzima por electrodo. Posteriormente, se estudió su respuesta frente a concentraciones crecientes de etanol en un intervalo de 0.5 mM a 15.5 mM, tal como se muestra en la figura 99. En la gráfica se aprecia un incremento en la respuesta biocatalítica en función del aumento de la carga enzimática hasta alcanzar un máximo que se corresponde a una carga enzimática de 25 unidades. A mayores cargas de enzima se produce una disminución de la respuesta del biosensor, este comportamiento puede ser debido a un posible exceso de proteína en la superficie biosensora, lo que dificulta la transferencia electrónica a través de la película; así como la difusión

del NADH enzimáticamente generado hacia la película electroinjertada de Azure A.

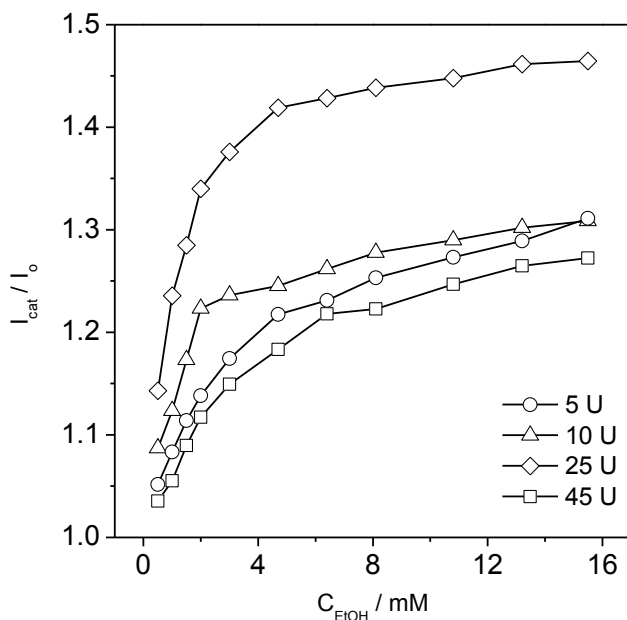


Fig. 99. Respuesta del biosensor en función de la carga enzimática: 5 U (círculos), 10 U (triángulos), 25 U (rombos) y 45 U (cuadrados) frente a concentraciones crecientes de EtOH (0 a 15.5 mM) en presencia de NAD<sup>+</sup> (1 mM) en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0.

Del presente estudio se deduce que la carga enzimática óptima son 25 unidades de enzima por electrodo, por tanto de ahora en adelante se utilizará esta carga de enzima en la preparación del biosensor.

## **5.2. Influencia de la concentración de nanopartículas de oro.**

Una vez optimizada la concentración de enzima, se optimizó la concentración de nanopartículas presente en el dispositivo biosensor. Para ello, tras el procedimiento de acondicionamiento de la película electroinjetada de Azure A, se modificaron cuatro electrodos serigrafiados de carbón con 0.5  $\mu\text{l}$  de disoluciones que contenían TOA-AuNPs en concentraciones de 1.4, 0.7, 0.63 y 0.35  $\mu\text{M}$ .

Como se muestra en la figura 100, la respuesta biocatalítica muestra una clara dependencia con la concentración de nanopartículas. La mayor respuesta se obtuvo para una concentración de TOA-AuNPs de 0.63  $\mu\text{M}$ . A concentraciones de nanopartículas superiores, la respuesta biocatalítica disminuye. Este efecto puede ser debido a que un exceso de nanopartículas sobre la capa biosensora podría suponer la existencia de impedimentos estéricos y dificultar que la enzima se orientara de forma adecuada sobre la superficie del electrodo modificado.

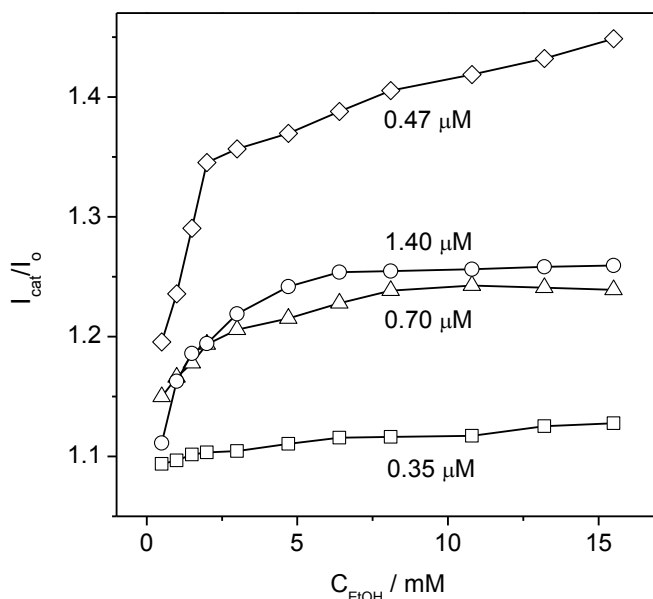


Fig. 100. Respuesta del biosensor en función de la concentración de nanopartículas de oro (TOA-AuNPs) utilizada: 0.35 (cuadrados), 0.47 (rombos), 0.70 (triángulos) y 1.40  $\mu\text{M}$  (círculos) frente a concentraciones crecientes de etanol para una concentración de enzima de 25 U en presencia de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0.

### 5.3. Optimización de la concentración de $\text{NAD}^+$ en la respuesta del biosensor.

Dada la importancia que representa el coenzima  $\text{NAD}^+$  en el mecanismo de la enzima, un factor clave en la optimización de los parámetros del biosensor será regular la concentración del coenzima disponible para la enzima. Con el objetivo de estudiar cuál es la concentración más adecuada de coenzima  $\text{NAD}^+$ , se estudió la respuesta del biosensor cuando se adicionan distintas concentraciones de coenzima  $\text{NAD}^+$  en la disolución de la celda en presencia de etanol. En la figura 101 se puede apreciar como la respuesta aumenta al aumentar la concentración de coenzima en la disolución, hasta alcanzar un máximo de respuesta para

concentraciones de  $\text{NAD}^+$  de 1 mM. Por otra parte, cuando la concentración de  $\text{NAD}^+$  es superior a ésta, la respuesta del biosensor decae, lo cual parece indicar la existencia de un comportamiento característico de inhibición por exceso de sustrato, tanto  $\text{NAD}^+$  como etanol.

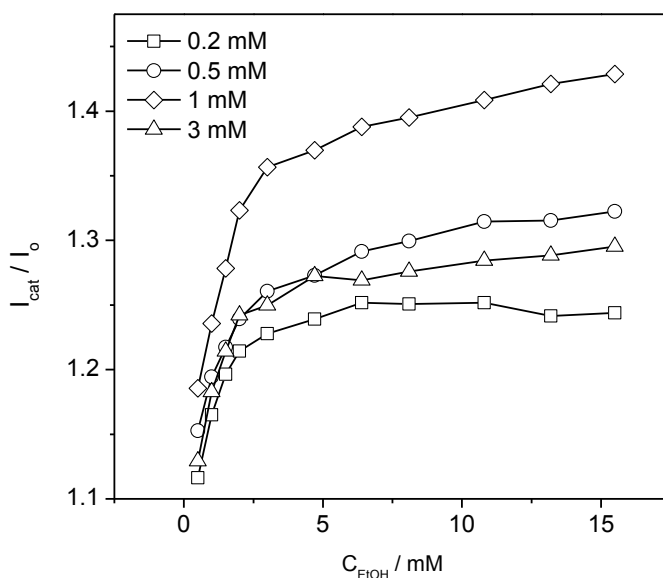


Fig. 101. Estudio de la influencia de la concentración del cofactor  $\text{NAD}^+$  en la respuesta biocatalítica frente a la oxidación de EtOH en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0 en función de la concentración de coenzima  $\text{NAD}^+$ : 0.2 mM (cuadrados), 0.5 mM (círculos), 1 mM (triángulos) y 3 mM (rombos). ADH (25 U/eldo) y concentración de TOA-AuNPs 0.47  $\mu\text{M}$ .

Este comportamiento de inhibición ha sido previamente descrito en la bibliografía por Utecht, quien mediante estudios espectrofotométricos observó una disminución en la cinética de la reacción enzimática a valores en la concentración de coenzima por encima de 1.0 mM [189].

#### **5.4. Efecto del pH.**

Dado que la reacción enzimática es un proceso que implica la transferencia de protones entre la enzima y el cofactor, es de esperar que la respuesta del biosensor sea dependiente de pH. Por tanto es uno de los parámetros a optimizar.

Se ha descrito en la bibliografía que la enzima alcohol deshidrogenasa presenta una respuesta dependiente del pH, donde el intervalo óptimo de trabajo se encuentra entre valores de pH de 7 y 9. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que la constante de enlace del  $\text{NAD}^+$  a la enzima presenta una respuesta de tipo gaussiana en función del pH, obteniéndose valores máximos para pH por encima de  $\text{pK}_a$  8 y 9 [190].

Se estudió la respuesta del biosensor de etanol en disoluciones reguladoras de fosfato (0.1 M) a pH 6, 7, 8 y 8.5. En la figura 102, se puede observar que la respuesta del biosensor aumenta desde pH 6 hasta alcanzar un máximo a pH 8, disminuyendo está a valores superiores de pH. En el inserto de la figura 102, para mayor claridad, se representa la respuesta del biosensor para una concentración de 1mM de etanol.



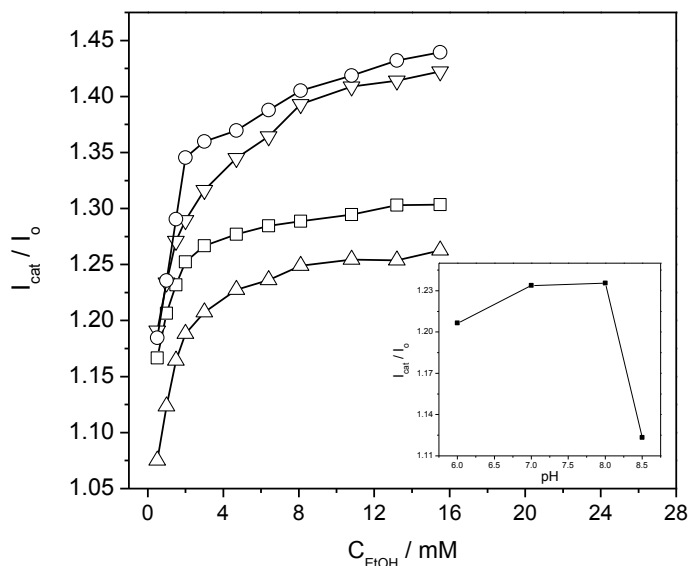


Fig. 102. A) Respuesta del biosensor desarrollado frente a concentraciones crecientes de etanol en tampón fosfato (0.1M) pH 6.0 (cuadrados), pH 7.0 (triángulos), pH 8.0 (círculos) y pH 8.5 (rombos). Inserto B. Respuesta biocatalítica en función del pH para una concentración de EtOH de 1mM. ADH: 25 U/eldo, concentración de TOA-AuNPs: 0.47  $\mu$ M y concentración de  $NAD^+$  1mM.

Con objeto de estudiar la respuesta del biosensor frente a un intervalo de pH más amplio, se utilizaron disoluciones reguladoras de otra naturaleza tales como tampón borato-cloruro pH 9 y 9.5 e incluso tampón Britton-Robinson en el intervalo de pH de 6 a 10. La respuesta voltamperométrica registrada en caso de utilizar tampón borato-cloruro se encuentra por debajo del valor obtenido para el tampón fosfato correspondiente a pH 8.5; mientras que las medidas registradas en tampón Britton-Robinson demostraron un comportamiento aleatorio en función del pH.

El pH óptimo de trabajo del biosensor concuerda con los descritos en la literatura para otros biosensores basados en la enzima

alcohol deshidrogenasa inmovilizada sobre soportes electródicos modificados con mediadores redox [191-193].

## **6. Propiedades analíticas del biosensor.**

Finalmente, se han determinado las características analíticas del biosensor desarrollado, para ello se obtuvieron las curvas de calibrado mediante voltametría diferencial de pulsos (DPV) de los biosensores fabricados con nanopartículas de oro recubiertas de ácido tióctico (TOA-AuNPs) y de mercaptohexanol (MCH-AuNPs). El barrido de potencial se efectuó desde -0.45 V hasta -0.05 V, siendo el intervalo de concentraciones estudiado de 0.66  $\mu\text{M}$  a 6.7 mM.

En la figura 103.A y 103.C se muestran los voltamogramas diferenciales de pulsos correspondientes a la adición de etanol en el intervalo de 0 a 4.9  $\mu\text{M}$  para los electrodos preparados de la misma forma, pero con nanopartículas modificadas con ácido tióctico (CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE) ó con mercaptohexanol (CHIT/ADH/MCH-AuNPs/AA/CSPE), respectivamente. En ambos casos, se produce un aumento significativo en la respuesta del biosensor tras la adición de etanol. En las figuras 103.B y 103.D se representan las curvas de calibrado de ambos biosensores, obtenidas a partir de los correspondientes voltamogramas diferenciales de impulsos, donde se representa la intensidad de corriente catalítica normalizada a la intensidad de pico en ausencia de etanol.

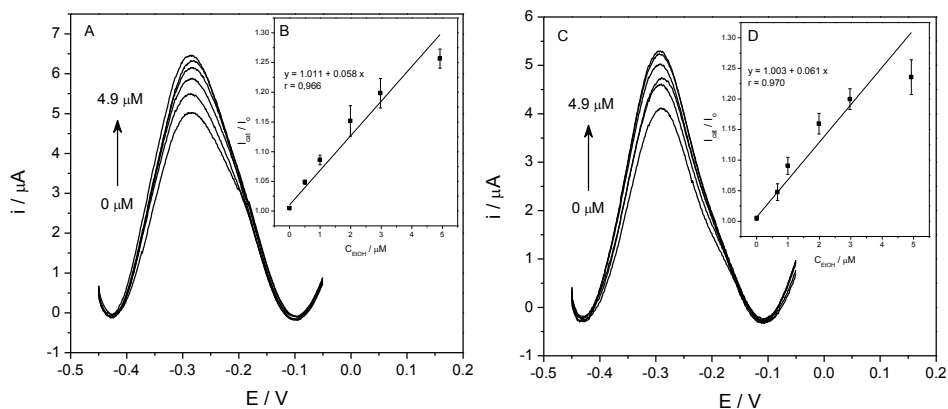


Fig. 103. A) y C). Voltamogramas diferenciales de pulsos (DPV) de los biosensores preparados según CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE y CHIT/ADH/MCH-AuNPs/AA/CSPE. Inserto B) y C). Curvas de calibrado correspondientes a los biosensores modificados con TOA-AuNPs y MCH-AuNPs, respectivamente frente a las adiciones de etanol registradas en los DPV de las figuras A y C.

Los parámetros analíticos de ambos biosensores se obtuvieron del primer tramo lineal de la curva de calibrado y se recogen en la tabla 12. Los límites de detección y cuantificación se calcularon con el criterio  $3\sigma_b/m$  y  $10\sigma_b/m$  para una serie de tres electrodos preparados de igual modo, donde  $\sigma_b$  es la desviación estándar del blanco y  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado. El límite de detección obtenido para los biosensores modificados con TOA-AuNPs y MCH-AuNPs fue de 0.14 y 0.19  $\mu\text{M}$  respectivamente; mientras que se obtuvieron unos valores para el límite de cuantificación de 0.36 y 0.63  $\mu\text{M}$  para TOA-AuNPs y MCH-AuNPs.

Tabla 12. Parámetros analíticos obtenidos para los biosensores preparados con nanopartículas TOA-AuNPs y MCH-AuNPs.

	Sensibilidad (mM <sup>-1</sup> )	Intervalo lineal (mM)	Límite de detección (μM)	Límite de determinación (μM)	Reproducibilidad (RSD%)
<i>TOA - AuNps</i>	$0.076 \pm 0.001$	$0.001 - 2$	$0.14 \pm 0.1$	$0.36 \pm 0.01$	8.0
<i>MCH - AuNps</i>	$0.061 \pm 0.004$	$0.001 - 2$	$0.19 \pm 0.03$	$0.63 \pm 0.03$	9.7

Con ambos biosensores se obtienen buenos límites de detección y cuantificación, por lo que podrían utilizarse en la determinación analítica de etanol en muestras de sangre o en alimentos. No obstante, el biosensor preparado con nanopartículas TOA-AuNPs exhibe límites de detección y cuantificación inferiores y una mayor sensibilidad que los obtenidos con el biosensor MCH-AuNPs.

Como se ha descrito previamente, la reproducibilidad del método se expresa como el porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD %). Esta se evaluó tras comparar las señales analíticas obtenidas para tres dispositivos biosensores diferentes, preparados del mismo modo, para la misma concentración de etanol (4.92 μM). El valor teórico obtenido para el coeficiente de variación de Horwitz, CV<sub>H</sub>, se estimó en un 12.6 %. Por otro lado la desviación estándar relativa obtenida cuando se preparó el biosensor con nanopartículas TOA-AuNPs fue del 8.0%, mientras que cuando se utilizaron nanopartículas MCH-AuNPs fue de 9.7%. Ambos resultados se encuentran por debajo del CV<sub>H</sub>, por tanto se garantiza la reproducibilidad del método para ambos dispositivos biosensores.

El biosensor preparado con las nanopartículas TOA-AuNPs presenta unos parámetros analíticos sensiblemente mejores que el preparado con nanopartículas MCH-AuNPs, por este motivo fue

elegido para establecer una comparativa con biosensores de alcohol deshidrogenasa descritos en la bibliografía actual. Es reseñable destacar que el valor de límite de detección e intervalo de respuesta lineal obtenido con el dispositivo biosensor desarrollado es inferior o igual al de los biosensores reportados en la bibliografía (Tabla 13). Cuando se utilizan nanopartículas de oro en la construcción del biosensor [175, 192, 194-197], el límite de detección obtenido en todos ellos es, al menos, de un orden de magnitud superior al descrito en este trabajo. A modo de ejemplo, el biosensor desarrollado por Zhang [198] con unas características de preparación similares al descrito en el presente trabajo, presenta un límite de detección dos órdenes de magnitud mayor y un menor intervalo de respuesta lineal. Si el biosensor desarrollado en esta tesis se compara con dispositivos que presentan un límite de detección del mismo orden de magnitud, como el desarrollado por Q. Xie [199] en el que utiliza grafeno reducido y politionina como plataforma de inmovilización de la enzima, el biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE presenta ventajas adicionales como un intervalo lineal más amplio. Por último, el dispositivo desarrollado en el presente trabajo reporta valores de límite de detección e intervalo lineal análogos al biosensor de ADH diseñado mediante métodos electroquimioluminiscentes por Gao y colaboradores [200], una metodología que logra disminuir en gran medida el límite de detección [201].

Tabla 13. Parámetros analíticos de biosensores de ADH existentes en la bibliografía comparados con el biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE desarrollado.

<i>Biosensor</i>	<i>LD</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Intervalo lineal</i> ( <i>mM</i> )	<i>RSD</i> (%)	<i>Ref.</i>
AuNPs/ADH-MPTS/Au	20	0.5 - 2.5	n.d.	[185]
CHIT/ADH/AuNPs/RGO-PD/GCE	88	0.1 - 3.0	7.8	[189]
ADH/PDDA-CNTs/GCE	24	0.05 - 0.3	3.1	[187]
ADH/IL-graphene-CHIT/GCE	5.0	0.025 - 0.2	4.2	[186]
ADH/PEDOT/AuNPs/CSPE	2.0	0.005 - 0.1	4.4	[188]
ADH/TRGO/Ru(bpy)/GCE	0.1	0.001 - 2.0	9.7	[191]
ADH-CHIT-MDB-GMCs/CSPE	80	0.5 - 15	3.8	[183]
ADH/ERGO-PTH/GCE	0.3	0.05 - 1.0	5.2	[190]
ADH/TB/GCE	140	0.5 - 4.0	<6	[78]
ADH/GN-AuNRs/GCE	1.5	0.005 - 0.4	4.6	[166]
CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE	0.14	0.001 - 2.0	8.0	Presente trabajo

MPTS (Mercaptopropiltrimetoxisilano), RGO (Grafeno oxidado reducido, térmicamente (TRGO) o electroquímicamente (ERGO)), PD (Polidopamina), PDDA (Polidialildimetilamonio), IL (Líquido iónico), CHIT (quitosano), PEDOT (Polietilendioxitifeno), MDB (Azul de Meldola), GMC (Carbono grafitizado mesoporoso), PTH (Poli-Tiofeno), TB (Azul de Toluidina), GN (Grafeno), AuNR (Nanorods de oro).

En vista a los resultados obtenidos se puede concluir que el biosensor de etanol desarrollado presenta las adecuadas características analíticas para llevar a cabo la determinación cuantitativa de etanol.

### 6.1. Estabilidad y tiempo de vida del dispositivo biosensor.

Finalmente se evaluó la estabilidad del dispositivo, para ello se llevó a cabo la preparación de seis biosensores del mismo modo en las condiciones previamente optimizadas. Posteriormente se obtuvo su respuesta secuencialmente durante un periodo de un mes

en intervalos definidos frente a disoluciones de tampón fosfato pH 8.0 (0.1M) que contenía  $\text{NAD}^+$  y etanol en concentración 1 mM. Los electrodos se almacenaron protegidos del exterior, en sequedad y a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

En la figura 104, se muestra la respuesta relativa del biosensor en función del tiempo de almacenaje. Cuando el dispositivo se almacena en las condiciones adecuadas, la respuesta se mantiene prácticamente constante incluso durante un mes. Este hecho es indicativo de que la metodología de modificación descrita permite preservar la actividad de la enzima en el tiempo, lo cual conlleva una gran ventaja a la hora de llevar a cabo análisis de rutina en un laboratorio.

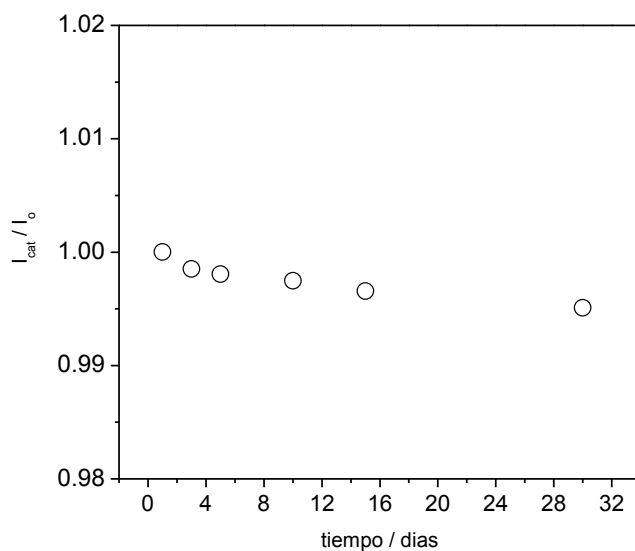


Fig. 104. Respuesta de una serie de biosensores CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE preparados del mismo modo medidos en el intervalo de un mes frente a la oxidación de etanol 1mM en presencia de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0.

Por otra parte, se evaluó el tiempo de vida del biosensor. Para ello se obtuvo la respuesta biocatalítica del dispositivo frente a una concentración de etanol de 1mM durante 15 días. El almacenamiento entre medidas se efectuó bajo las mismas condiciones que las descritas en el estudio previo.

En la figura 105 se representa la respuesta relativa del biosensor en los sucesivos días normalizada a la obtenida el primer día. Como puede observarse, pese a que en las medidas realizadas durante la primera semana apenas se observa una pérdida en la respuesta del 20 %; posteriormente, se produce una disminución brusca de la respuesta que alcanza el 70 % de la respuesta inicial. Este hecho posiblemente se pueda adscribir a los efectos de envenenamiento de la superficie del biosensor por parte del NADH generado enzimáticamente.

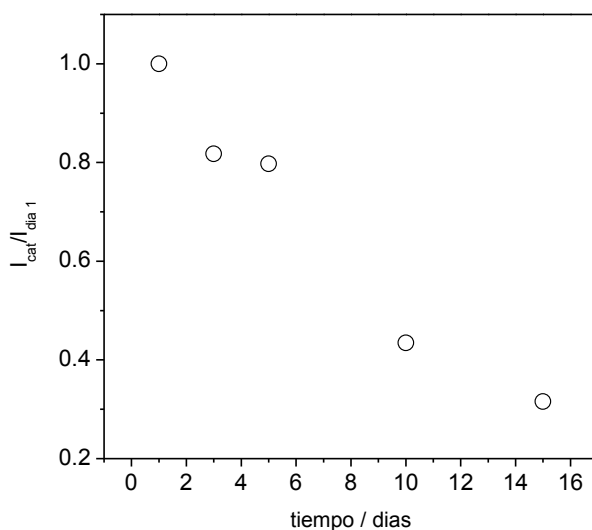


Fig. 105. Vida media relativa del biosensor CHIT/ADH/TOA-AuNPs/AA/CSPE respecto a la oxidación de etanol 1mM en presencia de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) en tampón fosfato (0.1M) pH 8.0.



Los resultados obtenidos permiten concluir, por tanto, que se ha logrado desarrollar un biosensor de etanol basado en la interacción de las nanopartículas de oro modificadas con ácido tióctico y la enzima ADH cuyas propiedades analíticas tales como límite de detección, intervalo lineal y reproducibilidad hacen de este un dispositivo viable en la determinación cuantitativa de etanol. Además, su estabilidad permite almacenarlo por largo tiempo lo que es un factor importante con vistas a su comercialización.



# CONCLUSIONES

---



**Conclusiones.**

A partir de los objetivos generales planteados al inicio de la presente tesis doctoral y en base a los resultados y conclusiones parciales más destacados expuestos durante el desarrollo de esta memoria, se puede concluir:

1. En primer lugar, se ha llevado a cabo la modificación superficial de materiales, como carbono y oro, utilizados como electrodos mediante electroinjerto de sales de diazonio. Asimismo se ha demostrado inequívocamente que el procedimiento de electroinjerto da lugar a dispositivos electrónicos más estables y con mejores propiedades electrocatalíticas.
2. Se ha diseñado y desarrollado una novedosa plataforma sensora basada en la interacción de un nanomaterial, como el grafeno oxidado, con un transductor de oro modificado mediante una monocapa autoensamblada. El electrodo híbrido obtenido ha sido caracterizado mediante diferentes técnicas y finalmente se ha estudiado su comportamiento frente al electroinjerto de Azure A.
3. Se ha estudiado la cinética de formación, así como el espesor y las propiedades ópticas y viscoelásticas de las películas electroinjertadas de Azure A mediante microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) y elipsometría espectroscópica. Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento de dichas películas se produce por formación de multicapas.
4. Se ha descubierto que la elección cuidadosa de las variables experimentales en la etapa de electroinjerto permite modular

propiedades como el espesor, la transferencia electrónica a través de la película, las propiedades viscoelásticas y electrocatalíticas de los dispositivos obtenidos. Estos resultados permiten obtener dispositivos con características específicas en función de la aplicación requerida.

5. Los electrodos modificados obtenidos mediante electroinjerto de Azure A se han utilizado en la oxidación electrocatalítica de NADH.
6. La propiedad de los electrodos modificados para la oxidación electrocatalítica de NADH se ha utilizado para el desarrollo de sensores NADH. Los resultados obtenidos, en términos de detección, sensibilidad y reproducibilidad, confirman que dichos sensores pueden utilizarse en la determinación cuantitativa de NADH.
7. Se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante la metodología descrita por Brust-Schiffrin. Las nanopartículas obtenidas se han recubierto de dos ligandos tiol, ácido tióctico y mercaptohexanol, cuyos grupos funcionales permiten la interacción de estas con el centro activo de la enzima.
8. Se ha desarrollado un biosensor amperométrico basado en la formación de un bioconjugado entre la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH) y las nanopartículas de oro sintetizadas. El biosensor obtenido muestra una excelente respuesta biocatalítica respecto a la oxidación de etanol, obteniéndose una constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) de  $0.63 \mu\text{M}$ .
9. Por último, se han estudiado las propiedades analíticas del biosensor. El biosensor desarrollado presenta excelentes propiedades analíticas: un amplio intervalo lineal ( $0.001 - 2 \mu\text{M}$ ),

un límite de detección (0.14 M) más bajo que los reportados en la bibliografía actual, y una buena reproducibilidad (8%) por lo que puede ser utilizado en la determinación analítica de etanol.





# REFERENCIAS

---



**Referencias.**

- [1] Chemical sensors. Definitions and classification, *Pure Appl. Chem.*, 63 (1991) 1247-1250.
- [2] X. Zhang, H. Ju, J. Wang, *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*, Academic Press 2011.
- [3] Z. Zou, A. Jang, E. MacKnight, P.-M. Wu, J. Do, P.L. Bishop, C.H. Ahn, Environmentally friendly disposable sensors with microfabricated on-chip planar bismuth electrode for in situ heavy metal ions measurement, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134 (2008) 18-24.
- [4] J.M.P. Carrazón, P.S. Batanero, *Química electroanalítica: fundamentos y aplicaciones*, Síntesis 1999.
- [5] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley 1980.
- [6] J.-C. Vidal, E. Garcia-Ruiz, J.-R. Castillo, Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors, *Microchim. Acta*, 143 (2003) 93-111.
- [7] R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, Poly(neutral red): Electrosynthesis, Characterization, and Application as a Redox Mediator, *Electroanalysis*, 20 (2008) 1275-1285.
- [8] E. Fitzer, R. Weiss, Effect of surface treatment and sizing of c-fibres on the mechanical properties of cfr thermosetting and thermoplastic polymers, *Carbon*, 25 (1987) 455-467.
- [9] L.J. Kopley, A.J. Bard, Ellipsometric, electrochemical, and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation, *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 1459-1467.
- [10] W.P. Hoffman, W.C. Hurley, T.W. Owens, H.T. Phan, Advantage of the scanning tunnelling microscope in documenting changes in carbon fibre surface morphology brought about by various surface treatments, *J Mater Sci*, 26 (1991) 4545-4553.
- [11] M. D'Amours, D. Belanger, Stability of Substituted Phenyl Groups Electrochemically Grafted at Carbon Electrode Surface, *J. Phys. Chem. B*, 107 (2003) 4811-4817.
- [12] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Saveant, Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 201-207.
- [13] D.L. Elbert, J.A. Hubbell, Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility, *Annual Review of Materials Science*, 26 (1996) 365-394.
- [14] D.S. Wavhal, E.R. Fisher, Hydrophilic modification of polyethersulfone membranes by low temperature plasma-induced graft polymerization, *Journal of Membrane Science*, 209 (2002) 255-269.
- [15] H.Y. Huang, C.M. Wang, Phenothiazine: An Effective Molecular Adhesive for Protein Immobilization, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (2010) 3560-3567.
- [16] Q. Li, J. Imbrogno, G. Belfort, X.-L. Wang, Making polymeric membranes antifouling via "grafting from" polymerization of zwitterions, *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (2015) n/a-n/a.

- [17] C. Combellas, M. Delamar, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Spontaneous Grafting of Iron Surfaces by Reduction of Aryldiazonium Salts in Acidic or Neutral Aqueous Solution. Application to the Protection of Iron against Corrosion, *Chemistry of Materials*, 17 (2005) 3968-3975.
- [18] S.A. Piletsky, E.V. Piletska, B. Chen, K. Karim, D. Weston, G. Barrett, P. Lowe, A.P.F. Turner, Chemical Grafting of Molecularly Imprinted Homopolymers to the Surface of Microplates. Application of Artificial Adrenergic Receptor in Enzyme-Linked Assay for  $\beta$ -Agonists Determination, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 4381-4385.
- [19] A. Bossi, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, P.G. Righetti, A.P.F. Turner, Surface-Grafted Molecularly Imprinted Polymers for Protein Recognition, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 5281-5286.
- [20] S. Jiang, J. Deng, W. Yang, Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes by Thermo-Grafting with  $\alpha$ -Methylstyrene-Containing Copolymers, *Macromolecular Rapid Communications*, 29 (2008) 1521-1526.
- [21] R. Inoubli, S. Dagreou, M.-H. Delville, A. Lapp, J. Peyrelasse, L. Billon, In situ thermo-dependant trapping of carbon radicals: a versatile route to well-defined polymer-grafted silica nanoparticles, *Soft Matter*, 3 (2007) 1014-1024.
- [22] A. Bojko, G. Andreatta, F. Montagne, P. Renaud, R. Pugin, Fabrication of thermo-responsive nano-valve by grafting-to in melt of poly(N-isopropylacrylamide) onto nanoporous silicon nitride membranes, *Journal of Membrane Science*, 468 (2014) 118-125.
- [23] T. Rohr, E.F. Hilder, J.J. Donovan, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Photografting and the Control of Surface Chemistry in Three-Dimensional Porous Polymer Monoliths, *Macromolecules*, 36 (2003) 1677-1684.
- [24] Z. Li, A. Ajami, E. Stankevičius, W. Husinsky, G. Račiukaitis, J. Stampfl, R. Liska, A. Ovsianikov, 3D photografting with aromatic azides: A comparison between three-photon and two-photon case, *Optical Materials*, 35 (2013) 1846-1851.
- [25] L. Renaudie, C. Le Narvor, E. Lepleux, P. Roger, Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Fibers by Photografting of a Carbohydrate Derivatized with a Phenyl Azide Group, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 679-685.
- [26] S.K. Kim, S. Jeon, Improved electrocatalytic effect of carbon nanomaterials by covalently anchoring with CoTAPP via diazonium salt reactions, *Electrochemistry Communications*, 22 (2012) 141-144.
- [27] N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, M. Mermoux, S. Cosnier, Wiring Laccase on Covalently Modified Graphene: Carbon Nanotube Assemblies for the Direct Bio-electrocatalytic Reduction of Oxygen, *Chemistry – A European Journal*, 21 (2015) 3198-3201.
- [28] P. Griess, On the action of cyanogen upon picraminic acid, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, XV 447.
- [29] N. Kornblum, G.D. Cooper, J.E. Taylor, Chemistry of diazo compounds. II. Evidence for a free radical chain mechanism in the reduction of diazonium salts by hypophosphorous acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 3013-3021.
- [30] E.D. Hughes, C.K. Ingold, J.H. Ridd, Kinetics and mechanism of diazotization, *Nature (London, U. K.)*, 166 (1950) 642-643.
- [31] J.H. Ridd, Nitrosation, diazotisation, and deamination, *Quarterly Reviews, Chemical Society*, 15 (1961) 418-441.
- [32] R.W. Wrenn, N. Katoh, R.C. Schatzman, J.F. Kuo, Inhibition by phenothiazine antipsychotic drugs of calcium-dependent phosphorylation of

- cerebral cortex proteins regulated by phospholipid or calmodulin, *Life Sciences*, 29 (1981) 725-733.
- [33] X.-F. Che, S.-I. Akiyama, A. Tomoda, Suppression of the proliferation of cancer cell lines, KB-3-1 and K562 cells preceded by a decrease in intracellular pH caused by phenoxazine derivatives, *Oncol. Rep.*, 19 (2008) 1253-1258.
- [34] J.M. Turner, A.J. Messenger, Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production, *Adv Microb Physiol*, 27 (1986) 211-275.
- [35] L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson, Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, meldonia blue, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 161 (1984) 103-120.
- [36] B. Persson, A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3- $\beta$ -naphthoyl-toluidine blue O, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 287 (1990) 61-80.
- [37] Y. Kong, J. Ou, Z. Liu, S. Xue, Y. Tao, J. Ma, The electrocatalytic characteristics of poly(azure B) and its application in the sensitive determination of hydroquinone, *Analytical Methods*, 6 (2014) 3735-3740.
- [38] J. Liu, S. Mu, The electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue, *Synthetic Metals*, 107 (1999) 159-165.
- [39] A. Silber, N. Hampf, W. Schuhmann, Poly(methylene blue)-modified thick-film gold electrodes for the electrocatalytic oxidation of NADH and their application in glucose biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (1996) 215-223.
- [40] S. Abdellaoui, M. Bekhouche, A. Noiriél, R. Henkens, C. Bonaventura, L.J. Blum, B. Doumeche, Rapid electrochemical screening of NAD-dependent dehydrogenases in a 96-well format, *Chemical Communications*, 49 (2013) 5781-5783.
- [41] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5883-5884.
- [42] R.M. Eloffson, THE POLAROGRAPHIC REDUCTION OF DIAZOTIZED AROMATIC AMINES, *Canadian Journal of Chemistry*, 36 (1958) 1207-1210.
- [43] E.R. Atkinson, H.H. Warren, P.I. Abell, R.E. Wing, A Polarographic Examination of Diazotized Amines<sup>1</sup>, *Journal of the American Chemical Society*, 72 (1950) 915-918.
- [44] Y.-C. Liu, R.L. McCreery, Reactions of Organic Monolayers on Carbon Surfaces Observed with Unenhanced Raman Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 117 (1995) 11254-11259.
- [45] T. Itoh, R.L. McCreery, In Situ Raman Spectroelectrochemistry of Electron Transfer between Glassy Carbon and a Chemisorbed Nitroazobenzene Monolayer, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 10894-10902.
- [46] A.J. Bard, J.C. Gilbert, R.D. Goodin, Application of spin trapping to the detection of radical intermediates in electrochemical transformations, *Journal of the American Chemical Society*, 96 (1974) 620-621.
- [47] F. Le Floch, J.-P. Simonato, G. Bidan, Electrochemical signature of the grafting of diazonium salts: A probing parameter for monitoring the electro-addressed functionalization of devices, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 3078-3085.

- [48] J.K. Kariuki, M.T. McDermott, Nucleation and Growth of Functionalized Aryl Films on Graphite Electrodes, *Langmuir*, 15 (1999) 6534-6540.
- [49] J.L. Bahr, J. Yang, D.V. Kosynkin, M.J. Bronikowski, R.E. Smalley, J.M. Tour, Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 6536-6542.
- [50] J.R. Lomeda, C.D. Doyle, D.V. Kosynkin, W.-F. Hwang, J.M. Tour, Diazonium Functionalization of Surfactant-Wrapped Chemically Converted Graphene Sheets, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008) 16201-16206.
- [51] M.-C. Bernard, A. Chausse, E. Cabet-Deliry, M.M. Chehimi, J. Pinson, F. Podvorica, C. Vautrin-UI, Organic Layers Bonded to Industrial, Coinage, and Noble Metals through Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 3450-3462.
- [52] F. Mirkhalaf, J. Paprotny, D.J. Schiffrin, Synthesis of Metal Nanoparticles Stabilized by Metal-Carbon Bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 7400-7401.
- [53] C.H. de Villeneuve, J. Pinson, M.C. Bernard, P. Allongue, Electrochemical Formation of Close-Packed Phenyl Layers on Si(111), *The Journal of Physical Chemistry B*, 101 (1997) 2415-2420.
- [54] M.P. Stewart, F. Maya, D.V. Kosynkin, S.M. Dirk, J.J. Stapleton, C.L. McGuinness, D.L. Allara, J.M. Tour, Direct Covalent Grafting of Conjugated Molecules onto Si, GaAs, and Pd Surfaces from Aryldiazonium Salts, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2003) 370-378.
- [55] A. Laforgue, T. Addou, D. Belanger, Characterization of the Deposition of Organic Molecules at the Surface of Gold by the Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations, *Langmuir*, 21 (2005) 6855-6865.
- [56] A. Adenier, M.-C. Bernard, M.M. Chehimi, E. Cabet-Deliry, B. Desbat, O. Fagebaume, J. Pinson, F. Podvorica, Covalent Modification of Iron Surfaces by Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 4541-4549.
- [57] L. Laurentius, S.R. Stoyanov, S. Gusarov, A. Kovalenko, R. Du, G.P. Lopinski, M.T. McDermott, Diazonium-Derived Aryl Films on Gold Nanoparticles: Evidence for a Carbon-Gold Covalent Bond, *ACS Nano*, 5 (2011) 4219-4227.
- [58] S. Mahouche-Chergui, S. Gam-Derouich, C. Mangeney, M.M. Chehimi, Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 4143-4166.
- [59] C. Saby, B. Ortiz, G.Y. Champagne, D. Bélanger, Electrochemical Modification of Glassy Carbon Electrode Using Aromatic Diazonium Salts. 1. Blocking Effect of 4-Nitrophenyl and 4-Carboxyphenyl Groups, *Langmuir*, 13 (1997) 6805-6813.
- [60] J. Wang, J.A. Carlisle, Covalent immobilization of glucose oxidase on conducting ultrananocrystalline diamond thin films, *Diamond and Related Materials*, 15 (2006) 279-284.
- [61] A. Vakurov, C.E. Simpson, C.L. Daly, T.D. Gibson, P.A. Millner, Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2004) 1118-1125.
- [62] M. Delamar, G. Désarmot, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Savéant, Modification of carbon fiber surfaces by electrochemical reduction of

aryl diazonium salts: Application to carbon epoxy composites, *Carbon*, 35 (1997) 801-807.

[63] R. McCreery, J. Dieringer, A.O. Solak, B. Snyder, A.M. Nowak, W.R. McGovern, S. DuVall, Molecular Rectification and Conductance Switching in Carbon-Based Molecular Junctions by Structural Rearrangement Accompanying Electron Injection, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 10748-10758.

[64] C. Fave, V. Noel, J. Ghilane, G. Trippé-Allard, H. Randriamahazaka, J.C. Lacroix, Electrochemical Switches Based on Ultrathin Organic Films: From Diode-like Behavior to Charge Transfer Transparency, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 18638-18643.

[65] J.K. Kariuki, M.T. McDermott, Formation of Multilayers on Glassy Carbon Electrodes via the Reduction of Diazonium Salts, *Langmuir*, 17 (2001) 5947-5951.

[66] M. Ceccato, A. Bousquet, M. Hinge, S.U. Pedersen, K. Daasbjerg, Using a Mediating Effect in the Electroreduction of Aryldiazonium Salts To Prepare Conducting Organic Films of High Thickness, *Chemistry of Materials*, 23 (2011) 1551-1557.

[67] G. Sauerbrey, The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing, *Z. Phys.*, 155 (1959) 206-222.

[68] A.L. Gui, G. Liu, M. Chockalingam, G. Le Saux, J.B. Harper, J.J. Gooding, A Comparative Study of Modifying Gold and Carbon Electrode with 4-Sulfophenyl Diazonium Salt, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1283-1289.

[69] C. Combellas, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Sterically Hindered Diazonium Salts for the Grafting of a Monolayer on Metals, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 8576-8577.

[70] A. Bousquet, M. Ceccato, M. Hinge, S.U. Pedersen, K. Daasbjerg, Redox Grafting of Diazotated Anthraquinone as a Means of Forming Thick Conducting Organic Films, *Langmuir*, 28 (2012) 1267-1275.

[71] F. Pariente, F. Tobalina, G. Moreno, L. Hernández, E. Lorenzo, H.D. Abruña, Mechanistic Studies of the Electrocatalytic Oxidation of NADH and Ascorbate at Glassy Carbon Electrodes Modified with Electrodeposited Films Derived from 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 4065-4075.

[72] E. Lorenzo, F. Pariente, L. Hernandez, F. Tobalina, M. Darder, Q. Wu, M. Maskus, H.D. Abruna, Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 13 (1998) 319-332.

[73] W.J. Blaedel, R.A. Jenkins, Study of a reagentless lactate electrode, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1240-1247.

[74] A.E.G. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H.A.O. Hill, W.J. Aston, I.J. Higgins, E.V. Plotkin, L.D.L. Scott, A.P.F. Turner, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 667-671.

[75] B. Prieto-Simón, E. Fàbregas, Comparative study of electron mediators used in the electrochemical oxidation of NADH, *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2004) 1131-1138.

[76] C.-X. Cai, K.-H. Xue, Electrochemical polymerization of toluidine blue o and its electrocatalytic activity toward NADH oxidation, *Talanta*, 47 (1998) 1107-1119.

[77] H.-Y. Chen, D.-M. Zhou, J.-J. Xu, H.-Q. Fang, Electrocatalytic oxidation of NADH at a gold electrode modified by thionine covalently bound to self-

- assembled cysteamine monolayers, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 422 (1997) 21-25.
- [78] N.-B. Li, J.-P. Duan, G.-N. Chen, Electrochemical polymerization of azure blue II and its electrocatalytic activity toward NADH oxidation, *Chinese Journal of Chemistry*, 21 (2003) 1191-1197.
- [79] A. Torstensson, L. Gorton, Catalytic oxidation of NADH by surface-modified graphite electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 130 (1981) 199-207.
- [80] B. Doumèche, L.J. Blum, NADH oxidation on screen-printed electrode modified with a new phenothiazine diazonium salt, *Electrochemistry Communications*, 12 (2010) 1398-1402.
- [81] Z. Nasri, E. Shams, M. Ahmadi, Direct Modification of a Glassy Carbon Electrode with Toluidine Blue Diazonium Salt: Application to NADH Determination and Biosensing of Ethanol, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1917-1925.
- [82] S. Abdellaoui, B.C. Corgier, C.A. Mandon, B. Doumèche, C.A. Marquette, L.J. Blum, Biomolecules Immobilization Using the Aryl Diazonium Electrografting, *Electroanalysis*, 25 (2013) 671-684.
- [83] J. Wang, L. Chen, A. Mulchandani, P. Mulchandani, W. Chen, Remote Biosensor for In-Situ Monitoring of Organophosphate Nerve Agents, *Electroanalysis*, 11 (1999) 866-869.
- [84] H. Yao, A.J. Shum, M. Cowan, I. Lähdesmäki, B.A. Parviz, A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3290-3296.
- [85] A. Heller, M.V. Pishko, Detecting preferential monosaccharide levels in human using electrochemical detector; grafting detector into human, generating calibration value and monitoring detector signals, Google Patents, 2000.
- [86] Z. Chu, L. Shi, Y. Zhang, W. Jin, S. Warren, D. Ward, E. Dempsey, Single layer Prussian blue grid as a versatile enzyme trap for low-potential biosensors, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 14874-14879.
- [87] M. Thust, M.J. Schöning, J. Vetter, P. Kordos, H. Lüth, A long-term stable penicillin-sensitive potentiometric biosensor with enzyme immobilized by heterobifunctional cross-linking, *Analytica Chimica Acta*, 323 (1996) 115-121.
- [88] W.J. Li, X.G. Wei, W. Cong, F. Ouyang, Simultaneous analysis of low concentrations of glucose, ethanol and glycerol by high performance liquid chromatographic method, *Se Pu*, 18 (2000) 170-172.
- [89] J.A. Ragazzo-Sanchez, P. Chalier, C. Ghommidh, Coupling gas chromatography and electronic nose for dehydration and desalcoholization of alcoholized beverages: Application to off-flavour detection in wine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106 (2005) 253-257.
- [90] A.K. Wanekaya, M. Uematsu, M. Breimer, O.A. Sadik, Multicomponent analysis of alcohol vapors using integrated gas chromatography with sensor arrays, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 110 (2005) 41-48.
- [91] V. Stone, B. Nowack, A. Baun, N. van den Brink, F. von der Kammer, M. Dusinska, R. Handy, S. Hankin, M. Hassellöv, E. Joner, T.F. Fernandes, Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation, *Science of The Total Environment*, 408 (2010) 1745-1754.
- [92] A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, *Nat Mater*, 6 (2007) 183-191.



- [93] D.A.C. Brownson, L.J. Munro, D.K. Kampouris, C.E. Banks, *Electrochemistry of graphene: not such a beneficial electrode material?*, *RSC Advances*, 1 (2011) 978-988.
- [94] N. Leconte, J. Moser, P. Ordejon, H. Tao, A. Lherbier, A. Bachtold, F. Alsina, C.M. Sotomayor Torres, J.-C. Charlier, S. Roche, *Damaging Graphene with Ozone Treatment: A Chemically Tunable Metal-Insulator Transition*, *ACS Nano*, 4 (2010) 4033-4038.
- [95] M. Zhou, Y. Zhai, S. Dong, *Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide*, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 5603-5613.
- [96] X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai, *Nanographene oxide for cellular imaging and drug delivery*, *Nano Res.*, 1 (2008) 203-212.
- [97] K.P. Loh, Q. Bao, G. Eda, M. Chhowalla, *Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications*, *Nat Chem*, 2 (2010) 1015-1024.
- [98] H. Tateishi, K. Hatakeyama, C. Ogata, K. Gezuhara, J. Kuroda, A. Funatsu, M. Koinuma, T. Taniguchi, S. Hayami, Y. Matsumoto, *Graphene Oxide Fuel Cell*, *Journal of The Electrochemical Society*, 160 (2013) F1175-F1178.
- [99] S. Chen, J. Zhu, X. Wu, Q. Han, X. Wang, *Graphene Oxide-MnO<sub>2</sub> Nanocomposites for Supercapacitors*, *ACS Nano*, 4 (2010) 2822-2830.
- [100] R. Sharma, J.H. Baik, C.J. Perera, M.S. Strano, *Anomalous Large Reactivity of Single Graphene Layers and Edges toward Electron Transfer Chemistries*, *Nano Lett.*, 10 (2010) 398-405.
- [101] E. Bekyarova, M.E. Itkis, P. Ramesh, C. Berger, M. Sprinkle, W.A. de Heer, R.C. Haddon, *Chemical Modification of Epitaxial Graphene: Spontaneous Grafting of Aryl Groups*, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 1336-1337.
- [102] F.M. Koehler, A. Jacobsen, K. Ensslin, C. Stampfer, W.J. Stark, *Selective Chemical Modification of Graphene Surfaces: distinction Between Single- and Bilayer Graphene*, *Small*, 6 (2010) 1125-1130.
- [103] J.-H. Chen, W.G. Cullen, C. Jang, M.S. Fuhrer, E.D. Williams, *Defect Scattering in Graphene*, *Physical Review Letters*, 102 (2009) 236805.
- [104] P. Huang, H. Zhu, L. Jing, Y. Zhao, X. Gao, *Graphene Covalently Binding Aryl Groups: Conductivity Increases Rather than Decreases*, *ACS Nano*, 5 (2011) 7945-7949.
- [105] H. Hou, X. Hu, X. Liu, W. Hu, R. Meng, L. Li, *Sulfonated graphene oxide with improved ionic performances*, *Ionics*, (2015) 1-5.
- [106] R. Ledezma, L. Arizmendi, J.A. Rodriguez, A. Castaneda, R.F. Ziolo, *Synthesis and characterization of ionic graphene oxides (GO) for the generation of new multilayered structures and hybrid GO/polymer nanocomposites*, *Macromol. Symp.*, 325-326 (2013) 141-146.
- [107] G. Chen, S. Zhai, Y. Zhai, K. Zhang, Q. Yue, L. Wang, J. Zhao, H. Wang, J. Liu, J. Jia, *Preparation of sulfonic-functionalized graphene oxide as ion-exchange material and its application into electrochemiluminescence analysis*, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3136-3141.
- [108] V.K. Gupta, M.L. Yola, N. Atar, Z. Ustundag, A.O. Solak, *A novel sensitive Cu(II) and Cd(II) nanosensor platform: Graphene oxide terminated p-aminophenyl modified glassy carbon surface*, *Electrochim. Acta*, 112 (2013) 541-548.

- [109] L. Zhang, Y. Li, Z. Li, D.-W. Li, D. Karpuzov, Y.-T. Long, Electrocatalytic oxidation of NADH on Graphene Oxide and reduced Graphene Oxide modified screen-printed electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 819-829.
- [110] E. Katz, I. Willner, J. Wang, Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles, *Electroanalysis*, 16 (2004) 19-44.
- [111] J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 5848-5866.
- [112] I. Willner, R. Baron, B. Willner, Integrated nanoparticle–biomolecule systems for biosensing and bioelectronics, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1841-1852.
- [113] Y. Wu, S. Hu, Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins, *Microchimica Acta*, 159 (2007) 1-17.
- [114] R.A. Marcus, On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I, *The Journal of Chemical Physics*, 24 (1956) 966-978.
- [115] R.A. Marcus, N. Sutin, Electron transfers in chemistry and biology, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 811 (1985) 265-322.
- [116] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle, *Science*, 299 (2003) 1877-1881.
- [117] J.M. Abad, S.F.L. Mertens, M. Pita, V.M. Fernández, D.J. Schiffrin, Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 5689-5694.
- [118] P.S. Jensen, Q. Chi, F.B. Grumsen, J.M. Abad, A. Horsewell, D.J. Schiffrin, J. Ulstrup, Gold Nanoparticle Assisted Assembly of a Heme Protein for Enhancement of Long-Range Interfacial Electron Transfer, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007) 6124-6132.
- [119] S.A. Ansari, Q. Husain, Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review, *Biotechnology Advances*, 30 (2012) 512-523.
- [120] J. Gao, X. Huang, H. Liu, F. Zan, J. Ren, Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging, *Langmuir*, 28 (2012) 4464-4471.
- [121] D. Geißler, L.J. Charbonnière, R.F. Ziessel, N.G. Butlin, H.-G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, Quantum Dot Biosensors for Ultrasensitive Multiplexed Diagnostics, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 1396-1401.
- [122] S.J. Park, O.S. Kwon, S.H. Lee, H.S. Song, T.H. Park, J. Jang, Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)-Type Bioelectronic Nose, *Nano Letters*, 12 (2012) 5082-5090.
- [123] J. Cheng, B.A. Tepy, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F.X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A.F. Radovic-Moreno, R. Langer, O.C. Farokhzad, Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery, *Biomaterials*, 28 (2007) 869-876.
- [124] W. Jia, A.J. Bandodkar, G. Valdés-Ramírez, J.R. Windmiller, Z. Yang, J. Ramírez, G. Chan, J. Wang, Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration, *Analytical Chemistry*, 85 (2013) 6553-6560.

- [125] K.W. Plaxco, H.T. Soh, Switch-based biosensors: a new approach towards real-time, in vivo molecular detection, *Trends in Biotechnology*, 29 1-5.
- [126] B.S. Ferguson, D.A. Hoggarth, D. Maliniak, K. Ploense, R.J. White, N. Woodward, K. Hsieh, A.J. Bonham, M. Eisenstein, T.E. Kippin, K.W. Plaxco, H.T. Soh, Real-Time, Aptamer-Based Tracking of Circulating Therapeutic Agents in Living Animals, *Science Translational Medicine*, 5 (2013) 213ra165.
- [127] E. Casero, A.M. Parra-Alfambra, M.D. Petit-Domínguez, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso, Differentiation between graphene oxide and reduced graphene by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), *Electrochemistry Communications*, 20 (2012) 63-66.
- [128] E. Sabatani, I. Rubinstein, R. Maoz, J. Sagiv, Organized self-assembling monolayers on electrodes. Part I. Octadecyl derivatives on gold, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 219 (1987) 365-371.
- [129] U. Oesch, J. Janata, Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold, *Electrochimica Acta*, 28 (1983) 1237-1246.
- [130] Y. Shen, P. Zhou, Q.Q. Sun, L. Wan, J. Li, L.Y. Chen, D.W. Zhang, X.B. Wang, Optical investigation of reduced graphene oxide by spectroscopic ellipsometry and the band-gap tuning, *Applied Physics Letters*, 99 (2011) -.
- [131] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 101 (1979) 19-28.
- [132] Z. Galus, *Fundamentals of electrochemical analysis*, Ellis Horwood 1976.
- [133] X.-C. Chen, T. Tao, Y.-G. Wang, Y.-X. Peng, W. Huang, H.-F. Qian, Azohydrazone tautomerism observed from UV-vis spectra by pH control and metal-ion complexation for two heterocyclic disperse yellow dyes, *Dalton Transactions*, 41 (2012) 11107-11115.
- [134] A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, Electrochemical Characterization of Commercial and Home-Made Screen-Printed Carbon Electrodes, *Analytical Letters*, 36 (2003) 2021-2039.
- [135] J. Pinson, F. Podvorica, Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts, *Chemical Society Reviews*, 34 (2005) 429-439.
- [136] Q. Gao, X. Cui, F. Yang, Y. Ma, X. Yang, Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system, *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2003) 277-282.
- [137] 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, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 3635-3642.
- [138] R.S. Nicholson, I. Shain, Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems, *Analytical Chemistry*, 36 (1964) 706-723.
- [139] P.N. Bartlett, P.R. Birkin, E.N.K. Wallace, Oxidation of [small beta]-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at poly(aniline)-coated electrodes, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 93 (1997) 1951-1960.
- [140] A.d.S. Santos, L. Gorton, L.T. Kubota, Nile blue adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic oxidation of NADH, *Electrochimica Acta*, 47 (2002) 3351-3360.

- [141] S. Warren, D.G. Rathod, T. McCormac, E. Dempsey, Investigations into the Use of a Thionine/PEDOT Layer as an NADH Electrocatalyst with Applications in Glutamate Sensing, *ECS Transactions*, 25 (2010) 21-32.
- [142] G. Qiang, S. Meng, P. Ping, Q. Honglan, Z. Chengxiao, Electro-oxidative polymerization of phenothiazine dyes into a multilayer-containing carbon nanotube on a glassy carbon electrode for the sensitive and low-potential detection of NADH, *Microchimica Acta*, 168 (2010) 299-307.
- [143] K.C. Lin, A.T. Ezhil Vilian, S.M. Chen, Using multi-walled carbon nanotubes to enhance coimmobilization of poly(azure A) and poly(neutral red) for determination of nicotinamide adenine dinucleotide and hydrogen peroxide, *RSC Advances*, 4 (2014) 45566-45574.
- [144] N.B. Li, J.P. Duan, G.N. Chen, Electrochemical polymerization of azure blue II and its electrocatalytic activity toward NADH oxidation, *Chinese Journal of Chemistry*, 21 (2003) 1191-1197.
- [145] A.J. Downard, Potential-Dependence of Self-Limited Films Formed by Reduction of Aryldiazonium Salts at Glassy Carbon Electrodes, *Langmuir*, 16 (2000) 9680-9682.
- [146] F. Anariba, S.H. DuVall, R.L. McCreery, Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy "Scratching", *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 3837-3844.
- [147] G. March, S. Reisberg, B. Piro, M.-C. Pham, C. Fave, V. Noel, Hydroxynaphthoquinone Ultrathin Films Obtained by Diazonium Electroreduction: Toward Design of Biosensitive Electroactive Interfaces, *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 3523-3530.
- [148] R. Lucklum, C. Behling, P. Hauptmann, Role of Mass Accumulation and Viscoelastic Film Properties for the Response of Acoustic-Wave-Based Chemical Sensors, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2488-2496.
- [149] M.A. Komkova, A. Holzinger, A. Hartmann, A.R. Khokhlov, C. Kranz, A.A. Karyakin, O.G. Voronin, Ultramicrosensors based on transition metal hexacyanoferrates for scanning electrochemical microscopy, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4 (2013) 649-654.
- [150] C.P. Andrieux, J.M. Saveant, Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 93 (1978) 163-168.
- [151] V. Roşca, L. Mureşan, I.C. Popescu, C. Cristea, I.A. Silberg, Gold electrodes modified with 16H,18H-Dibenzo[c,l]-7,9-dithia-16,18-diazapentacene for electrocatalytic oxidation of NADH, *Electrochemistry Communications*, 3 (2001) 439-445.
- [152] I. Bravo, T. García-Mendiola, M. Revenga-Parra, F. Pariente, E. Lorenzo, Diazonium salt click chemistry based multiwall carbon nanotube electrocatalytic platforms, *Sensors and Actuators B: Chemical*.
- [153] T. Hoshino, H. Muguruma, Selective Detection of NADH with Neutral Red Functionalized Carbon Nanotube/Plasma-polymerized Film Composite Electrode, *Electrochemistry*, 80 (2012) 85-87.
- [154] L. Deng, Y. Wang, L. Shang, D. Wen, F. Wang, S. Dong, A sensitive NADH and glucose biosensor tuned by visible light based on thionine bridged carbon nanotubes and gold nanoparticles multilayer, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008) 951-957.

- [155] I. Tiwari, M. Gupta, Neutral red interlinked gold nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes hybrid nanomaterial and its application for the detection of NADH, *Materials Research Bulletin*, 49 (2014) 94-101.
- [156] D. Chen, H. Feng, J. Li, Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications, *Chemical Reviews*, 112 (2012) 6027-6053.
- [157] Y. Lu, Y. Jiang, W. Wei, H. Wu, M. Liu, L. Niu, W. Chen, Novel blue light emitting graphene oxide nanosheets fabricated by surface functionalization, *Journal of Materials Chemistry*, 22 (2012) 2929-2934.
- [158] L. Gan, D. Zhang, X. Guo, Electrochemistry: An Efficient Way to Chemically Modify Individual Monolayers of Graphene, *Small*, 8 (2012) 1326-1330.
- [159] Z. Luo, Y. Lu, L.A. Somers, A.T.C. Johnson, High Yield Preparation of Macroscopic Graphene Oxide Membranes, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 898-899.
- [160] J. Han, C. Zhang, F. Liu, B. Liu, M. Han, W. Zou, L. Yang, Z. Zhang, Upconversion nanoparticles for ratiometric fluorescence detection of nitrite, *Analyst*, 139 (2014) 3032-3038.
- [161] M. Snehalatha, I. Hubert Joe, C. Ravikumar, V.S. Jayakumar, Azure A chloride: computational and spectroscopic study, *Journal of Raman Spectroscopy*, 40 (2009) 176-182.
- [162] S.-Y. Chen, P.-H. Ho, R.-J. Shiue, C.-W. Chen, W.-H. Wang, Transport/Magnetotransport of High-Performance Graphene Transistors on Organic Molecule-Functionalized Substrates, *Nano Letters*, 12 (2012) 964-969.
- [163] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science*, 306 (2004) 666-669.
- [164] J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, P. Solís-Fernández, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, Atomic Force and Scanning Tunneling Microscopy Imaging of Graphene Nanosheets Derived from Graphite Oxide, *Langmuir*, 25 (2009) 5957-5968.
- [165] S.R. Wasserman, G.M. Whitesides, I.M. Tidswell, B.M. Ocko, P.S. Pershan, J.D. Axe, The structure of self-assembled monolayers of alkylsiloxanes on silicon: a comparison of results from ellipsometry and low-angle x-ray reflectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 5852-5861.
- [166] K.N. Kudin, B. Ozbas, H.C. Schniepp, R.K. Prud'homme, I.A. Aksay, R. Car, Raman Spectra of Graphite Oxide and Functionalized Graphene Sheets, *Nano Letters*, 8 (2007) 36-41.
- [167] D.A. Sokolov, K.R. Shepperd, T.M. Orlando, Formation of Graphene Features from Direct Laser-Induced Reduction of Graphite Oxide, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1 (2010) 2633-2636.
- [168] F. Tuinstra, J.L. Koenig, Raman Spectrum of Graphite, *The Journal of Chemical Physics*, 53 (1970) 1126-1130.
- [169] A.C. Ferrari, J. Robertson, Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Physical Review B*, 61 (2000) 14095-14107.
- [170] E. Casero, C. Alonso, L. Vázquez, M.D. Petit-Domínguez, A.M. Parra-Alfambra, M. de la Fuente, P. Merino, S. Álvarez-García, A. de Andrés, F. Pariente, E. Lorenzo, Comparative Response of Biosensing Platforms Based on Synthesized Graphene Oxide and Electrochemically Reduced Graphene, *Electroanalysis*, 25 (2013) 154-165.

- [171] P.V. Kumar, N.M. Bardhan, S. Tongay, J. Wu, A.M. Belcher, J.C. Grossman, Scalable enhancement of graphene oxide properties by thermally driven phase transformation, *Nat Chem*, 6 (2014) 151-158.
- [172] G.E.P. BOX, H.L. LUCAS, DESIGN OF EXPERIMENTS IN NON-LINEAR SITUATIONS, *Biometrika*, 46 (1959) 77-90.
- [173] K. Büchner, N. Ehrhardt, B.P. Cahill, C. Hoffmann, Internal reflection ellipsometry for real-time monitoring of polyelectrolyte multilayer growth onto tantalum pentoxide, *Thin Solid Films*, 519 (2011) 6480-6485.
- [174] H. Chang, X. Wu, C. Wu, Y. Chen, H. Jiang, X. Wang, Catalytic oxidation and determination of [small beta]-NADH using self-assembly hybrid of gold nanoparticles and graphene, *Analyst*, 136 (2011) 2735-2740.
- [175] L. Li, H. Lu, L. Deng, A sensitive NADH and ethanol biosensor based on graphene–Au nanorods nanocomposites, *Talanta*, 113 (2013) 1-6.
- [176] D.W. Green, H.W. Sun, B.V. Plapp, Inversion of the substrate specificity of yeast alcohol dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 268 (1993) 7792-7798.
- [177] S. Lepinay, A. Staff, A. Ianoul, J. Albert, Improved detection limits of protein optical fiber biosensors coated with gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 52 (2014) 337-344.
- [178] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1994) 801-802.
- [179] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 4215-4221.
- [180] R. Fernández-Ruiz, Fluorescencia de Rayos X por Reflexion Total (TXRF). Una gran desconocida., *Anales de la RSEQ*, 106 (2010).
- [181] W. Suginta, P. Khunkaewla, A. Schulte, Electrochemical Biosensor Applications of Polysaccharides Chitin and Chitosan, *Chemical Reviews*, 113 (2013) 5458-5479.
- [182] F.M. Dickinson, G.P. Monger, A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates, *Biochemical Journal*, 131 (1973) 261-270.
- [183] E.I. Iwuoha, D. Saenz de Villaverde, N.P. Garcia, M.R. Smyth, J.M. Pingarron, Reactivities of organic phase biosensors. 2. The amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film, *Biosensors and Bioelectronics*, 12 (1997) 749-761.
- [184] H. Lineweaver, D. Burk, The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of the American Chemical Society*, 56 (1934) 658-666.
- [185] P. Du, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Single-walled carbon nanotubes functionalized with poly(nile blue A) and their application to dehydrogenase-based biosensors, *Electrochimica Acta*, 53 (2007) 1811-1823.
- [186] D.-W. Yang, H.-H. Liu, Poly(brilliant cresyl blue)-carbonnanotube modified electrodes for determination of NADH and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 733-738.
- [187] M.J. Lobo, A.J. Miranda, P. Tuñón, Flow-injection analysis of ethanol with an alcohol dehydrogenase-modified carbon past electrode, *Electroanalysis*, 8 (1996) 932-937.

- [188] J. Kochana, J. Adamski, Detection of NADH and ethanol at a graphite electrode modified with titania sol-gel/Meldola's Blue/MWCNT/Nafion nanocomposite film, *cent.eur.j.chem.*, 10 (2012) 224-231.
- [189] R.E. Utecht, A Kinetic Study of Yeast Alcohol Dehydrogenase, *Journal of Chemical Education*, 71 (1994) 436.
- [190] L.A. LeBrun, B.V. Plapp, Control of Coenzyme Binding to Horse Liver Alcohol Dehydrogenase, *Biochemistry*, 38 (1999) 12387-12393.
- [191] P. Luo, G. Xie, Y. Liu, H. Xu, S. Deng, F. Song, Electrochemical detection of blood alcohol concentration using a disposable biosensor based on screen-printed electrode modified with Nafion and gold nanoparticles, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, pp. 1641.
- [192] E. Hua, L. Wang, X. Jing, C. Chen, G. Xie, One-step fabrication of integrated disposable biosensor based on ADH/NAD<sup>+</sup>/meldola's blue/graphitized mesoporous carbons/chitosan nanobiocomposite for ethanol detection, *Talanta*, 111 (2013) 163-169.
- [193] A.S. Santos, A.C. Pereira, N. Durán, L.T. Kubota, Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and Meldola's Blue on multi-wall carbon nanotube, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 215-220.
- [194] B.K. Jena, C.R. Raj, Electrochemical Biosensor Based on Integrated Assembly of Dehydrogenase Enzymes and Gold Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 6332-6339.
- [195] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, Electrochemical determination of NADH and ethanol based on ionic liquid-functionalized graphene, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1504-1508.
- [196] B. Kowalewska, P.J. Kulesza, Toward More Efficient Bioelectrocatalytic Oxidation of Ethanol for Amperometric Sensing and Biofuel Cell Technology, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 9564-9571.
- [197] V. Serafin, L. Agúí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, A novel hybrid platform for the preparation of disposable enzyme biosensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodeposition in an ionic liquid medium onto gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656 (2011) 152-158.
- [198] J. Tian, S.-Y. Deng, D.-L. Li, D. Shan, W. He, X.-J. Zhang, Y. Shi, Bioinspired polydopamine as the scaffold for the active AuNPs anchoring and the chemical simultaneously reduced graphene oxide: Characterization and the enhanced biosensing application, *Biosensors and Bioelectronics*, 49 (2013) 466-471.
- [199] Z. Li, Y. Huang, L. Chen, X. Qin, Z. Huang, Y. Zhou, Y. Meng, J. Li, S. Huang, Y. Liu, W. Wang, Q. Xie, S. Yao, Amperometric biosensor for NADH and ethanol based on electroreduced graphene oxide-polythionine nanocomposite film, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181 (2013) 280-287.
- [200] W. Gao, Y. Chen, J. Xi, S. Lin, Y. Chen, Y. Lin, Z. Chen, A novel electrochemiluminescence ethanol biosensor based on tris(2,2'-bipyridine) ruthenium (II) and alcohol dehydrogenase immobilized in graphene/bovine serum albumin composite film, *Biosensors and Bioelectronics*, 41 (2013) 776-782.
- [201] A.M. García-Campaña, Baeyens, W.R.G., Chemiluminescence in Analytical Chemistry, *Photosynthetica*, 39 (2001) 204-204.





# PUBLICACIONES

---



---

Publicaciones a las que ha dado lugar la presente tesis doctoral:

- M, Revenga-Parra, C. Gomez-Anquela, T. Garcia-Mendiola, E. Gonzalez, F. Pariente, E. Lorenzo. *Grafted Azure A modified electrodes as disposable  $\beta$  nicotinamide adenine dinucleotide sensors*. **Analytica Chimica Acta**, **747**, (2012),**84-91**.
- C. Gomez-Anquela, M, Revenga-Parra J.M. Abad, A. García Marín, J.L. Pau, F. Pariente, J. Piqueras, E. Lorenzo. *Electrografting of N',N'-dimethylphenothiazin-5-ium-3,7-diamine (Azure A) diazonium salt forming electrocatalytic organic films on gold or graphene oxide gold hybrid electrodes*. **Electrochimica Acta**, **116**,(2014),**59-68**.
- C. Gomez-Anquela, T. Garcia-Mendiola, J.M. Abad, M.Pita, F. Pariente, E.Lorenzo. *Scaffold electrodes based on Thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor*. **Bioelectrochemistry (Pendiente de respuesta)**.

