



**PROPIEDADES ELECTROCATALÍTICAS Y
BIOELECTROCATALÍTICAS DE
NANOESTRUCTURAS BASADAS EN
MACROMOLÉCULAS FUNCIONALIZADAS CON
GRUPOS REDOX Y SUS APLICACIONES**

Memoria de tesis presentada en la Facultad de Ciencias de la
Universidad Autónoma de Madrid para optar al Grado de Doctor por el
licenciado:

CARLOS VILLENA MORALES



**Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad
Politécnica de Madrid**

Directora de tesis: Dra. María Pilar García Armada

Tutora académica: Dra. Beatriz Alonso Garrido

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios de investigación del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid y en los laboratorios de investigación del Departamento de Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid.

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto "Propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas de nanoestructuras basadas en dendrímeros organometálicos" (CTQ2009-12332-C02-02) y por una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2010-028705).



MARÍA PILAR GARCÍA ARMADA, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL Y DEL MEDIO AMBIENTE DE LA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral que presenta el licenciado Don **Carlos Villena Morales**, cuyo título es "PROPIEDADES ELECTROCATALÍTICAS Y BIOELECTROCATALÍTICAS DE NANOESTRUCTURAS BASADAS EN MACROMOLÉCULAS FUNCIONALIZADAS CON GRUPOS REDOX Y SUS APLICACIONES", ha sido realizada bajo mi dirección y reúne las condiciones requeridas para su presentación como un compendio de publicaciones para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Madrid a 23 de junio de dos mil diecisiete,

Vº Bº de la directora de Tesis

Vº Bº de la tutora de Tesis

Dra. María Pilar García Armada

Dra. Beatriz Alonso Garrido

A mi familia

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que de un modo u otro han compartido su tiempo conmigo y sin las cuales esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible.

Especialmente me gustaría dar las gracias a mi directora de Tesis, la Dra. M^a Pilar García Armada y al Dr. José Losada del Barrio por la confianza depositada en mí y por todo el apoyo recibido. Gracias Pilar por toda la ayuda que me has dado y todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años. Gracias José por tu dedicación, tu tiempo y todas esas charlas de ciencia y de no ciencia.

A mi tutora, la Dra. Beatriz Alonso Garrido y a la Dra. Carmen M. Casado Santana, por darme la oportunidad de iniciar mi camino en la investigación y posteriormente por haberme acogido en la Universidad Autónoma de Madrid. Gracias por haber compartido vuestros conocimientos de síntesis y todo el tiempo dedicado en este proyecto.

A todo el personal del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid y al personal del Centro Nacional de Microscopia Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid, ya que su trabajo ha sido imprescindible para llevar a cabo la caracterización de las macromoléculas y de los electrodos modificados que se presentan en esta Memoria.

A todos los compañeros con los que he compartido los laboratorios, tanto en la UAM como en la UPM: Almudena, Eduardo, Divesh, Isadora, Cristina, Alex, Mohammad, Azin, Khaled, Sonia, Dani, Ángel, Pedro y especialmente a mi cuñada Raquel.

A mis amigos: Sergio, Javi, Fer, Álvaro, Isma, Nieves, Charly, Luis, Roci, Chemi... gracias por compartir tantas horas de esfuerzo y a la par tantas horas de diversión. A mis compañeros de Normon, especialmente a: Fede, Anja, Flu,

Dani, Raquel, Marta, Bea, Mamen y Fer. Gracias a todos por apoyarme día a día, por no dejar que me rinda, por todos los grandes momentos vividos hasta ahora y por los que quedan por llegar.

Deseo dedicar unas palabras a mi familia, mis abuelos, mis tíos y muy especialmente mis padres por su cariño y apoyo desde que entré el primer día en el colegio hasta que cierro esta última etapa de formación académica, aunque algunos no se encuentren entre nosotros, siguen estando muy presentes. A mis padres quiero agradecerles todo el apoyo y el cariño, son un pilar muy importante en mi vida, aunque a veces no se lo demuestre. A mi hermano Joaquín, por todos los buenos momentos que hemos compartido y los que nos quedan por llegar. Aunque parezca muy lejano, Cambridge está a la vuelta de la esquina.

Por último quiero dedicar esta Tesis Doctoral a Marta, gracias por tu paciencia infinita, por tu comprensión y por apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago. Gracias por darme fuerza para luchar día a día para conseguir nuestros sueños, y sobre todo por estar a mi lado para que podamos cumplir todos los sueños de Martín.

Índice

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura de la memoria	3
1.2. Antecedentes del tema de trabajo	5
1.2.1. Electrocatálisis	5
1.2.2. Sensores y biosensores	6
1.2.3. Mediadores electroquímicos	9
1.2.4. Dendrímeros	12
1.2.5. Funcionalización de los dendrímeros	15
1.2.6. Polímeros hiperramificados	18
1.2.7. Nanopartículas metálicas	20
1.3. Objetivos de la Tesis Doctoral	26
1.4. Aportaciones originales del autor	30
1.5. Referencias	31

2. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

2.1. Nanopartículas de platino como base nanoestructurada para la deposición de dendrímeros y polímeros hiperramificados	39
2.1.1. Preparación y estudio de los electrodos	40
2.1.2. Electrodos basados en polímeros carbosilano funcionalizados con ferrocenos interaccionantes depositados sobre nanopartículas de platino	40
2.1.3. Electrodos basados en dendrímeros con esqueleto DAB funcionalizados con grupos amidoferroceno depositados sobre nanopartículas de platino	42
2.1.4. Aplicaciones de las superficies electródicas preparadas	45
2.1.5. Aplicación como biosensores NADH y alcoholes de los electrodos basados en polímeros carbosilano funcionalizados con ferrocenos interaccionantes depositados sobre nanopartículas de platino	45
2.1.6. Aplicación como sensores de Paracetamol de los electrodos basados en dendrímeros con esqueleto DAB funcionalizados con grupos amidoferroceno depositados sobre nanopartículas de platino	50
2.1.7. Publicaciones generadas y tareas realizadas	55

2.2. Síntesis de nanopartículas de oro interdendríticas e intradendríticas utilizando dendrímeros electrodepositados sobre electrodos como plantilla y sus aplicaciones en catálisis	56
2.2.1. Aplicaciones catalíticas de las superficies electródicas preparadas	63
2.2.2. Catalizador de reacción de reducción de oxígeno (ORR)	63
2.2.3. Sensor de dopamina	66
2.2.4. Sensor de peróxido de hidrógeno	70
2.2.5. Publicaciones generadas y tareas realizadas	76
2.3. Referencias	78
3. CONCLUSIONES	83
4. TRABAJOS PUBLICADOS	91
4.1. Sensors and Actuators B-Chemical, 2014, 190, 111	
4.2. Journal of Solid State Electrochemistry, 2016, 20, 1551	
4.3. Journal of the Electrochemical Society, 2017, 164 (6), H396	
4.4. Applied Surface Science, 2017, 420, 651	

INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

Según queda reflejado en el artículo 8 del "Procedimiento relativo al tribunal, defensa y evaluación de tesis doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid", el doctorando puede presentar la tesis doctoral como un compendio de publicaciones con la autorización expresa de su director de tesis y de la Comisión Académica, siempre y cuando tenga publicadas o admitidas un mínimo de tres contribuciones científicas en revistas de reconocido prestigio.

La presente memoria responde a los requisitos solicitados y está estructurada sobre cuatro artículos científicos en torno al tema del estudio de propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas de superficies electrónicas modificadas con macromoléculas electroactivas y de sus aplicaciones como mediadores electroquímicos.

Los artículos que integran la memoria son los siguientes:

Almudena Jiménez, M. Pilar García Armada, José Losada, **Carlos Villena**, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado.

Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles.

Sensors and Actuators B-Chemical, **2014**, 190, 111.

M. Pilar García Armada, Eduardo Vallejo, **Carlos Villena**, José Losada, Carmen M. Casado, Beatriz Alonso.

New acetaminophen amperometric sensor based on ferrocenyl dendrimers deposited onto Pt nanoparticles.

Journal of Solid State Electrochemistry, **2016**, 20, 1551.

Carlos Villena, José Losada, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado, M. Pilar García Armada.

Easy preparation of electrode surfaces with dispersed size-controlled Au nanoparticles by electrodeposited PPI-dendrimers as templates.

Journal of the Electrochemical Society, **2017**, 164 (6), H396.

Carlos Villena, Marta Bravo, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado, José Losada, M. Pilar García Armada.

Size-controlled gold nanoparticles obtained from electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimer-templates for the electrochemical sensing of dopamine.

Applied Surface Science, **2017**, 420, 651.

Otras contribuciones publicadas previamente o que actualmente están en preparación:

Carlos Villena, José Losada, Pilar García Armada, Carmen M. Casado, Beatriz Alonso.

Synthesis and electrochemical anion-sensing properties of a biferrocenyl-functionalized dendrimer.

Organometallics, **2012**, 8, 3284.

José Losada, Pilar García Armada, **Carlos Villena**, Divesh Punjabi, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado.

Electrodeposited ferrocenyl-dab as templates for the synthesis of inter and intra dendritic au nanoparticles.

Industriales Research Meeting 2016. Libro de actas. ISBN: 978-84-16397-31-0

Carlos Villena, Divesh Punjabi, Salvador León, Carmen M. Casado, Beatriz Alonso, José Losada, Pilar García Armada.

Size-controlled gold nanoparticles from electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) templates as hydrogen peroxide electrocatalyst. En preparación.

1.2. ANTECEDENTES DEL TEMA DE TRABAJO

1.2.1. ELECTROCATÁLISIS

Generalmente, las reacciones electroquímicas implican una cinética lenta de transferencia de electrones con el electrodo, lo que hace necesario la aplicación de sobrepotenciales que aumenten la velocidad de la reacción.

Electrocatalisis es la reducción de la energía de activación de una reacción electroquímica y puede consistir en una sencilla mediación de transferencia de carga, en la que los centros redox de la superficie del electrodo actúan sencillamente como conductores (catálisis redox), o bien puede ocurrir que la transformación redox del sustrato tenga lugar mediante una interacción química más íntima, que puede llegar a implicar coordinación al centro redox del catalizador (catálisis química o electroquímica).¹

Los mecanismos de electro-reducción y electro-oxidación se desarrollan de distinto modo sobre diferentes electrocatalizadores, siendo los más eficaces aquellos que presentan puntos superficiales en los que pueden producirse procesos de adsorción, que facilitan la ruptura y formación de enlaces. Dentro de este tipo de electrocatalizadores se encuentran metales de transición con orbitales d incompletos, siendo el platino el metal más eficaz en la mayoría de reacciones de interés práctico. Así pues los mejores electrodos son caros y presentan la desventaja adicional de ser muy proclives a la interacción con los venenos catalíticos.

Todo ello hace que la línea de investigación y desarrollo de nuevos electrocatalizadores con características mejoradas permanezca en continuo auge, sobre todo a partir de la incorporación de nanopartículas de distinta naturaleza.

1.2.2. SENSORES Y BIOSENSORES

Las tendencias actuales en ciencia están centradas principalmente en cuatro objetivos: la simplificación, la miniaturización, la automatización y la reducción de los costes. Los sensores son probablemente el ejemplo más significativo de simplificación, constituyendo una de las áreas más importantes en el campo de la investigación científica.

Un sensor químico o bioquímico es un dispositivo que responde de forma directa, reversible, continua y rápida a cambios de concentración de una especie química o bioquímica de una muestra. La zona donde tiene lugar la reacción química está conectada con un transductor que puede ser óptico, electroquímico, térmico o másico y esta conexión permite transformar la respuesta del sistema en información analítica.²

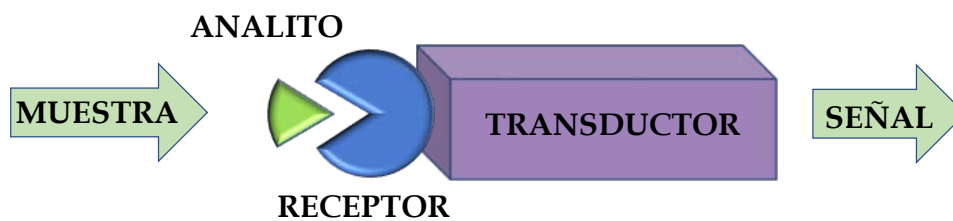


Figura 1.1. Esquema de un sensor.

Un sensor ideal debe proporcionar bajos límites de detección y determinación, alta selectividad, precisión y fiabilidad de la respuesta generada. Por otra parte, es conveniente que su funcionamiento sea reversible y que se obtenga una respuesta a tiempo real. Además, el tiempo de vida debe ser lo suficientemente largo como para utilizarlo en repetidas ocasiones.

Con respecto a los sistemas de detección, las técnicas electroquímicas son las que más se han empleado para el desarrollo de nuevos sensores debido a sus numerosas ventajas. Por ejemplo, solo son necesarios pequeños volúmenes de muestra, lo que facilita la miniaturización y la simplificación, así como la posibilidad de realizar análisis "in situ". Además, la señal producida es eléctrica lo que hace posible la transducción en tiempo real. Por otro lado, es

posible la detección de una gran cantidad de analitos debido a los adecuados límites de detección alcanzados.

Un biosensor es un sistema analítico constituido por un receptor biológico (enzimas, ácidos nucleicos, células, etc.) que está inmovilizado y es capaz de reconocer un analito. Este material está en contacto con un sistema transductor adecuado que convierte la señal bioquímica en una señal eléctrica que se puede cuantificar. Los biosensores presentan algunas limitaciones, como son la inestabilidad de los compuestos biológicos y el pequeño rango de señal que puede registrar debido a la saturación del elemento biológico.

El primer biosensor, desarrollado por Clark y Lyons,³ se empleó para la detección de glucosa y consistía en un electrodo de oxígeno en el que la enzima glucosa oxidasa se encontraba inmovilizada. Este dispositivo permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. Desde el desarrollo de este primer biosensor, se han desarrollado un gran número de sensores orientados a la determinación específica de un amplio abanico de biomoléculas con múltiples aplicaciones. Dentro de ellos, los biosensores basados en medidas electroquímicas son los que han alcanzado mayor nivel de desarrollo debido a su especial sensibilidad y selectividad.

Las propiedades eléctricas medidas mediante los biosensores electroquímicos pueden ser de diferentes tipos, en función de si miden cambios en el potencial (potenciometría), o cambios en la intensidad de corriente tras aplicar un potencial constante (amperometría).

Para llevar a cabo las medidas electroquímicas se requiere un equipo de medida (potenciómetro o potencióstato-galvanostato) y una celda electroquímica con tres electrodos:

- Electrodo de referencia que se caracteriza por mantener un valor de potencial constante.
- Electrodo de trabajo en el que tiene lugar la reacción de interés y que es susceptible de modificación con electrocatalizadores y/o receptores.

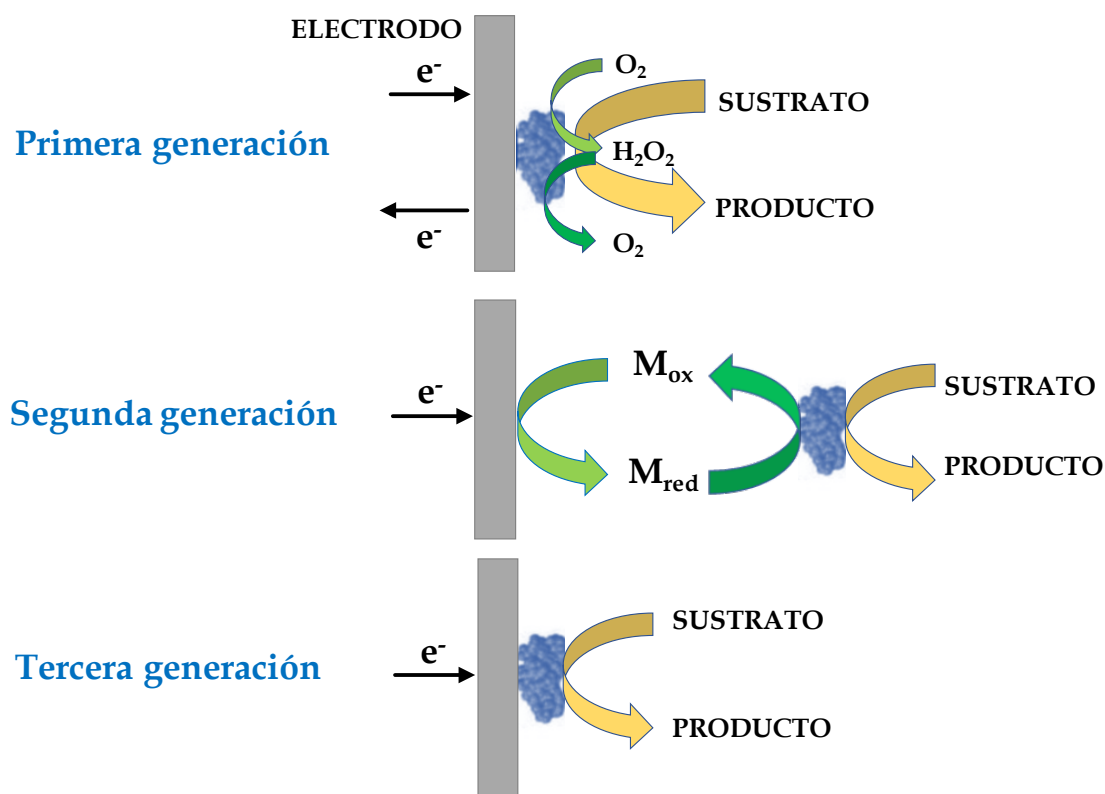
- Electrodo auxiliar que permite la circulación de corriente entre él y el electrodo de trabajo, evitando la caída óhmica entre los electrodos de trabajo y referencia.

Los biosensores desarrollados hasta el momento se clasifican dentro de tres tipos (esquema 1.1):

Primera generación: son aquellos en los cuales el producto normal de la reacción (por ejemplo, peróxido de hidrógeno en el caso de las oxidasas) se difunde al transductor y causa respuesta eléctrica. El regenerador de la enzima suele ser el natural (por ejemplo, el oxígeno) y se encuentra en disolución.⁴

Segunda generación: son aquellos que involucran mediadores específicos entre la reacción y el transductor con el fin de generar una respuesta mejorada. Estos mediadores suelen ser electrocatalizadores y se encuentran inmovilizados en contacto íntimo con la enzima y el transductor.⁵

Tercera generación: son aquellos donde la reacción de reconocimiento enzimático causa respuesta por sí misma y el producto no está involucrado directamente. Estos biosensores no requieren la presencia de mediadores y la electroquímica directa de las enzimas se consigue con superficies nanoestructuradas que contactan directamente con el centro activo de la enzima. Estos biosensores ofrecen sensibilidades muy altas.⁶



Esquema 1.1. Tipos de electrodos enzimáticos.

1.2.3. MEDIADORES ELECTROQUÍMICOS

Uno de los mayores inconvenientes derivado del uso de sensores electroquímicos es la contribución de sustancias interferentes, ya que el sensor se introduce en una muestra en la que se encuentran simultáneamente el analito y otras sustancias, que pueden ser también electroactivas y que pueden originar señal superpuesta. Además, pueden existir otros problemas como requerimiento de elevados sobrepotenciales y/o envenenamiento de la superficie electródica asociado a la adsorción de los productos de reacción, como ya se ha citado.⁷

Con el fin de reducir estos efectos, se han llevado a cabo numerosos estudios basados en la utilización de mediadores artificiales con propiedades electrocatalíticas. Estos mediadores son, fundamentalmente, moléculas o polímeros que facilitan la transferencia electrónica entre la especie a oxidar o

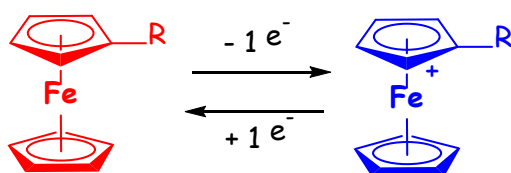
reducir (o la enzima) y la superficie del electrodo, de manera que se puedan utilizar potenciales menores para la detección y evitar interferencias.

Las características que debe reunir un buen mediador electroquímico son las siguientes:

- Reaccionar rápidamente y dar lugar a un proceso de transferencia electrónica reversible.
- Su potencial debe ser bajo y tiene que ser estable tanto en su forma oxidada como reducida.
- No reaccionar con otras especies que puedan estar presentes en el medio y tiene que ser independiente del pH.
- El potencial de trabajo seleccionado para realizar las medidas ha de ser tal que el mediador, tras haber reaccionado, se regenere dando lugar a una corriente que pueda relacionarse con la concentración de analito.

El ferroceno y sus derivados han sido empleados con éxito como mediadores para gran variedad de sistemas, incluyendo aquellos biosensores que contienen enzimas facilitando la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo.⁸

El ferroceno es un compuesto organometálico de hierro tipo sándwich (esquema 1.2) que se oxida de manera reversible 0.44 V (vs. SCE) para dar lugar al catión ferricinio y es en esta reacción en la que se basa su capacidad como mediador de transferencia electrónica.



Esquema 1.2. Oxidación reversible del ferroceno.

Las adecuadas propiedades electrónicas del ferroceno, su fácil funcionalización y su alta estabilidad térmica y fotoquímica en medios aerobios y acuosos, han permitido que sus derivados hayan encontrado innumerables aplicaciones en campos como la catálisis, la electroquímica y la medicina.⁹ Además, los mediadores que contienen ferroceno presentan características muy interesantes para la construcción de biosensores amperométricos debido a la reducción sustancial de la sobretensión requerida, que se traduce en una mejora de los efectos de los interferentes. Por otro lado, la síntesis de receptores con estos centros redox tiene un gran potencial en el campo del desarrollo de sensores químicos para la detección de especies no-electroactivas. Los receptores que contienen centros de ferroceno son especialmente interesantes para el reconocimiento de aniones y su detección, puesto que tiene lugar la formación de un par iónico entre el anión y la especie oxidada del ferroceno (ferricinio), cuya oxidación se produce electroquímicamente.¹⁰

Los objetivos principales en el campo de biosensores son la inmovilización de enzimas sin pérdida de su actividad¹¹ y el desarrollo de nuevos mediadores artificiales que faciliten la transferencia electrónica entre los centros activos de la enzima y el electrodo, con el fin de obtener dispositivos más sensibles, precisos, reproducibles, rápidos y duraderos. Según se ha podido demostrar, las macromoléculas altamente ramificadas, polímeros y dendrímeros, que incorporan en su estructura grupos ferroceno son muy eficaces como electrocatalizadores para peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos, para la fabricación de biosensores aerobios y anaerobios de glucosa, biosensores con peroxidasas o para la mediación directa de la oxidación de NADH,¹² en el caso de ferrocenos interaccionantes (ferrocenos que presentan comunicación electrónica entre ellos).

La funcionalización con ferrocenos electrónicamente comunicados soporta un gran interés, debido a las excelentes propiedades que han mostrado este tipo de ferrocenos como electrocatalizadores de diversas reacciones, tanto de oxidación como de reducción, con transferencia de dos electrones de manera simultánea.¹³

Un importante hecho adicional concerniente a los dendrímeros y polímeros funcionalizados con ferroceno es su capacidad para modificar electrodos debido al cambio de solubilidad asociado a la oxidación del ferroceno,¹⁴ que resulta en un material electroactivo que permanece persistentemente unido a la superficie del electrodo.

1.2.4. DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son macromoléculas globulares altamente ramificadas (figura 1.2), de geometría precisa y definida, cuya estructura puede ser controlada en el proceso de síntesis.¹⁵ El nombre de dendrímero se deriva de las palabras griegas *dendron*, que significa árbol, y *meros* que significa segmento, y se asignó a este tipo de compuestos debido a la estructura ramificada tipo árbol que presentan.

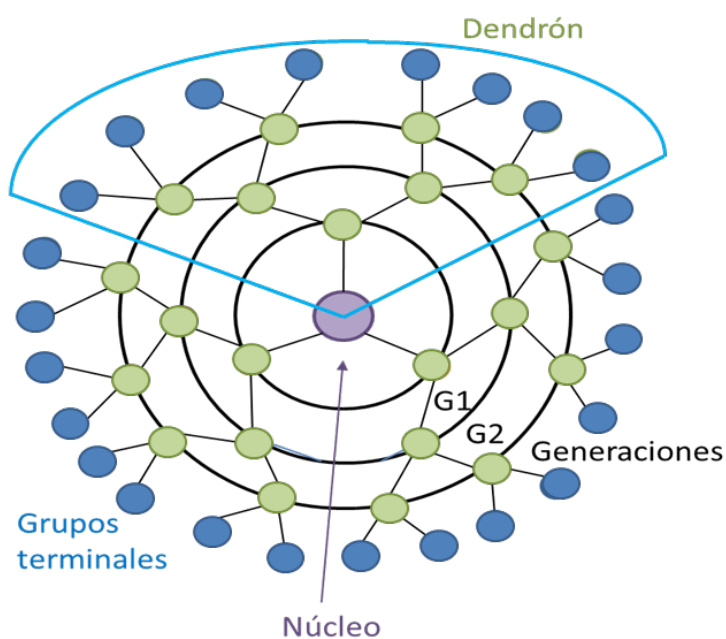
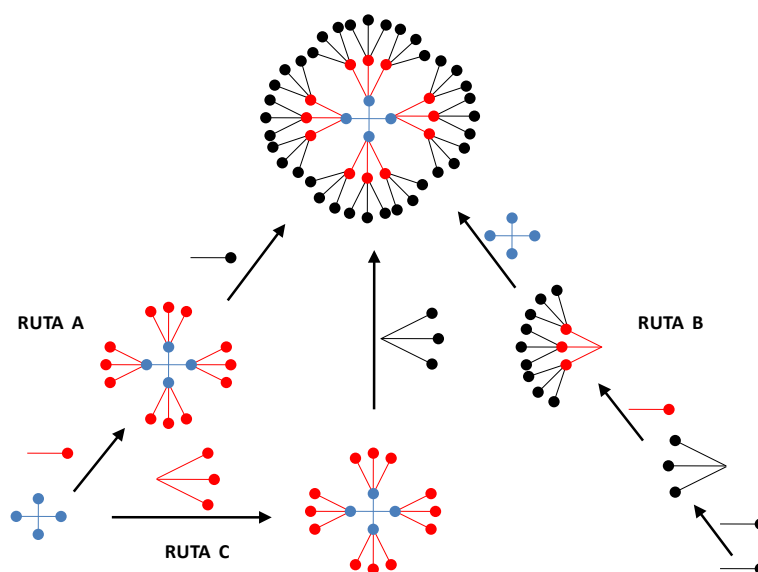


Figura 1.2. Representación de la estructura de un dendrímero.

La estructura de los dendrímeros se divide en diferentes regiones, donde el **núcleo** es el punto focal desde el cual surgen las diferentes ramas denominadas **dendrones**. Los dendrones contienen puntos de ramificación desde los cuales la molécula puede seguir creciendo, cada nueva capa

construida se denomina **generación** y se numeran desde el centro hacia la periferia. Los **grupos terminales** se encuentran situados en la superficie de la estructura y, dependiendo de su naturaleza, los dendrímeros variarán en forma, estabilidad, solubilidad, rigidez y viscosidad.

Los dendrímeros pueden construirse utilizando las denominadas estrategias de síntesis divergente¹⁶ y convergente,¹⁷ aunque también es posible un uso combinado de ambas (esquema 1.3).



Esquema 1.3. Representación de las estrategias de síntesis divergente (ruta A), convergente (ruta B) y mixta (ruta C)

➤ **Síntesis divergente:** se parte de un núcleo central multifuncional sobre el que se introducen reiteradamente nuevos centros de ramificación. Este método presenta la ventaja de que permite un crecimiento rápido del dendrímero, pero son necesarias grandes cantidades de reactivo, lo que provoca la aparición de huecos o imperfecciones en altas generaciones.

➤ **Síntesis convergente:** esta estrategia consiste en el crecimiento desde la periferia hasta el interior. La utilización de este método permite un mayor control de los grupos terminales situados en la superficie del dendrímero,

minimizando la aparición de defectos estructurales. Sin embargo, presenta una limitación en cuanto al tamaño de los dendrones.

➤ **Síntesis mixta:** consiste en una combinación de las estrategias de síntesis convergente y divergente, utilizando un núcleo central multifuncional y dendrones. La construcción de monómeros ramificados permite obtener varias familias dendríticas dependiendo del dendrón que sustituya cada grupo terminal.

En los dendrímeros de generaciones superiores, los grupos terminales se encuentran cada vez más próximos entre sí, por lo que a partir de una determinada generación se alcanza una congestión superficial que impide que siga creciendo.

La primera familia de estructuras dendríticas fue sintetizada por el grupo de Vögtle¹⁸ en 1978 basándose en la repetición de una secuencia de reacciones para dar lugar a aminas ramificadas de bajo peso molecular.

No fue hasta quince años después cuando el grupo de Meijer¹⁹ utilizó una modificación sobre la ruta sintética de Vögtle para conseguir la síntesis de los denominados dendrímeros polipropilamina (PPI) a gran escala. Esta familia de dendrímeros ha sido ampliamente utilizada por la facilidad con la que sus grupos terminales reaccionan con otras moléculas. Alternativamente, estos dendrímeros se denominan alternativamente por las siglas DAB (diaminobutano), debido al reactivo de partida utilizado para su síntesis.

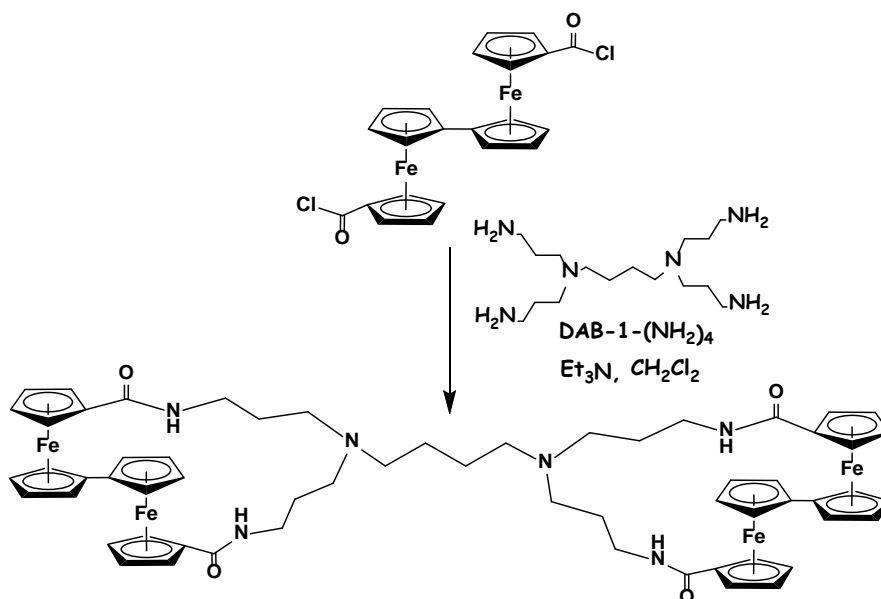
Desde la síntesis de las primeras estructuras dendríticas, su estudio ha atraído una gran atención científica debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, y en consecuencia, por sus potenciales aplicaciones en diferentes campos, tales como química, física, ingeniería, biología, medicina, etc.²⁰

1.2.5. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS DENDRÍMEROS

La incorporación de fragmentos organometálicos a la estructura dendrítica, en particular unidades de ferroceno, ha aportado a estas macromoléculas una gran versatilidad en cuanto a sus propiedades físico-químicas y a las aplicaciones para las que son adecuados.

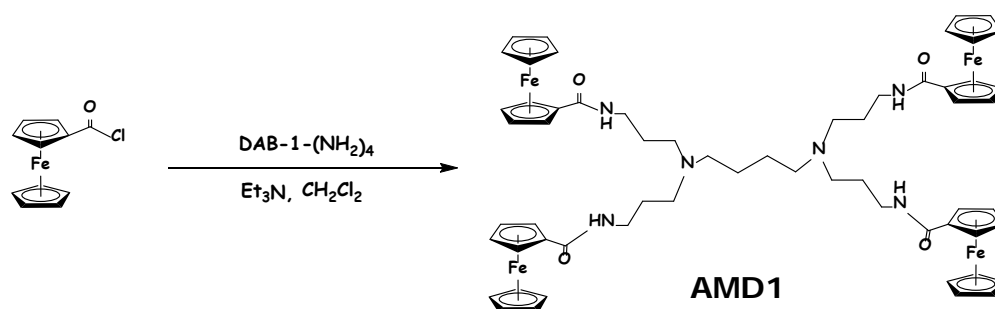
Nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en síntesis y funcionalización de dendrímeros con objeto de estudiar la variación de sus propiedades físico-químicas y sus aplicaciones electroquímicas, concretamente se han funcionalizado dendrímeros basados en esqueletos DAB con grupos amidoferroceno,^{14b} con grupos amidoferroceno y amidocobaltoceno,²¹ ferrocenos que contenían éteres corona,²² y octametilferroceno.²³

Debido a las excelentes propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas que muestran los compuestos que contienen ferroceno en su estructura y, en concreto, los compuestos que poseen dos centros metálicos unidos entre sí o coordinados a un átomo puente,²⁴ como trabajo previo a esta tesis, se sintetizó un derivado de biferroceno con el objetivo de funcionalizar una familia de dendrímeros DAB para estudiar sus propiedades catalíticas y como receptor, pero en lugar de seguir la estrategia sintética habitual funcionalizando el dendrímero con una molécula de biferroceno y dejando la otra libre,²⁵ decidimos introducir la novedad de funcionalizar con una molécula de biferroceno dos ramas formando un quelato sobre el dendrímero (esquema 1.4). Este dendrímero mostró excelentes propiedades como receptor de aniones,²⁶ sin embargo sus dificultades de solubilidad y el alto potencial de su sistema redox, nos hizo desistir de sus aplicaciones como mediador para la construcción de otros sensores y biosensores.



Esquema 1.4. Síntesis del dendrímero funcionalizado con biferroceno

Por estas razones, en esta tesis se decidió funcionalizar diferentes generaciones de dendrímeros DAB, tanto con grupos amidoferroceno^{14(b)} como con grupos aminoferroceno²⁷, siguiendo esquemas anteriormente publicados en la bibliografía (esquema 1.5, figura 1.3 y esquema 1.6 y figura 1.4 respectivamente). En los primeros, se hizo reaccionar el cloruro del ácido ferrocencarboxílico con los dendrímeros de 1^a generación DAB-1-(NH₂)₄, de 3^a generación DAB-3-(NH₂)₁₆ y de 5^a generación DAB-5-(NH₂)₆₄, para obtener los compuestos DAB-1-(NHCOFc)₄, **AMD1**, DAB-3-(NHCOFc)₁₆, **AMD3**, y DAB-5-(NHCOFc)₆₄, **AMD5**.



Esquema 1.5. Síntesis del dendrímero de primera generación funcionalizado con grupos amidoferroceno.

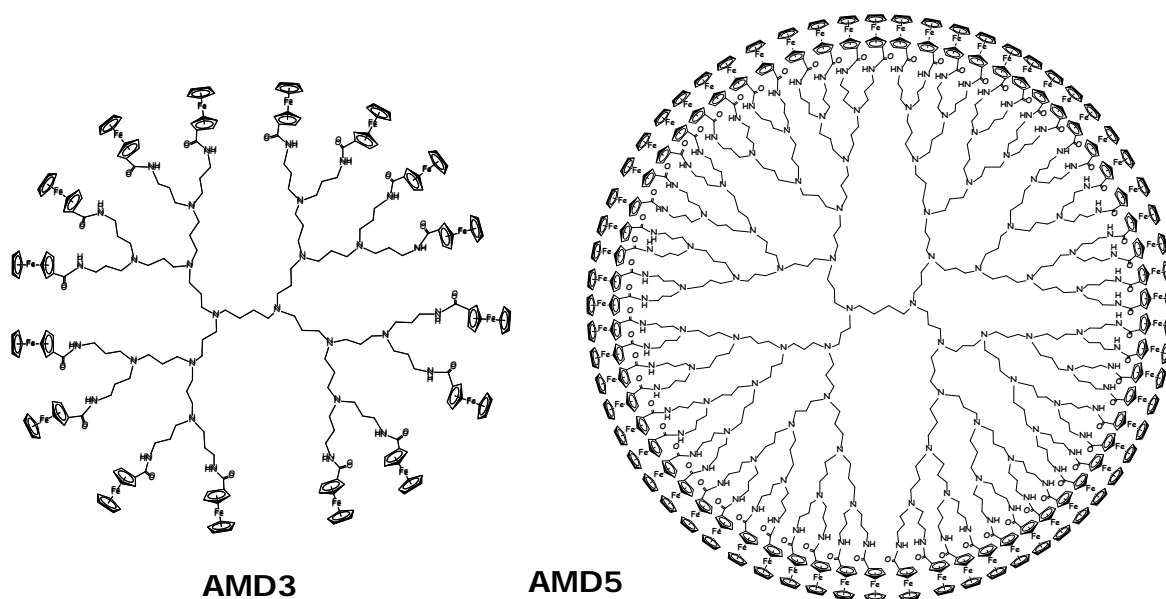
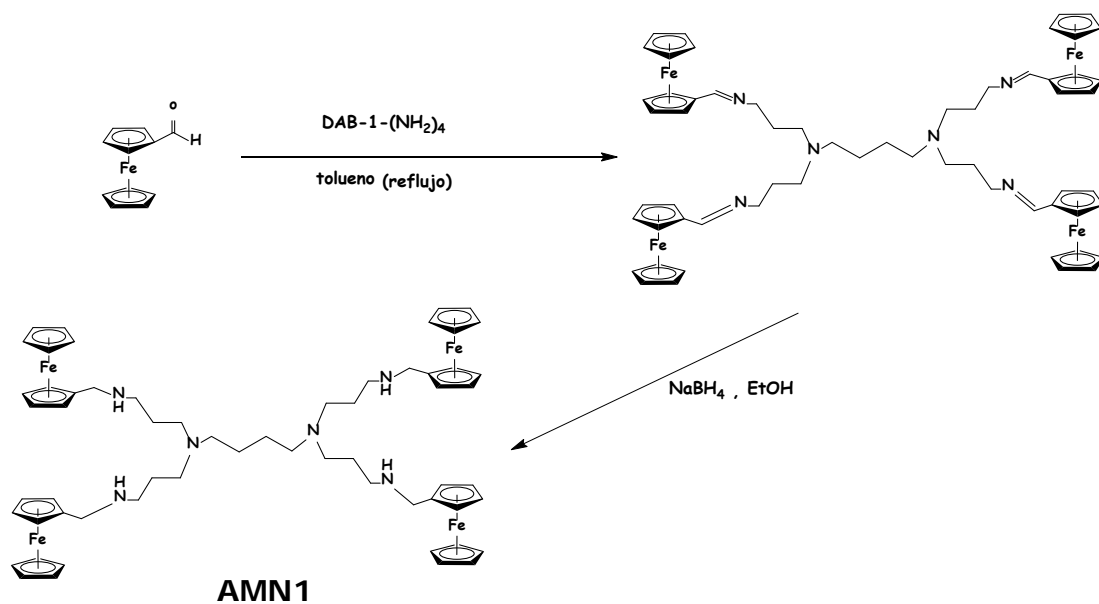


Figura 1.3. Dendrimeros de tercera y quinta generación funcionalizados con grupos amidoferroceno

En el segundo caso se hizo reaccionar el aldehído de ferroceno con DAB-1-(NH₂)₄, DAB-3-(NH₂)₁₆, DAB-5-(NH₂)₆₄ siguiendo el procedimiento descrito por Jutzi.²⁵



Esquema 1.6. Síntesis del dendrímtero de primera generación funcionalizado con grupos aminoferroceno.

Como se muestra en el esquema 1.6, en una primera etapa se obtiene un compuesto intermedio con un grupo imina, que posteriormente se reduce con NaBH_4 para dar lugar a los compuestos DAB-1-(NHCH_2Fc)₄, **AMN1**, DAB-3-(NHCH_2Fc)₁₆, **AMN3**, DAB-5-(NHCH_2Fc)₆₄, **AMN5**.

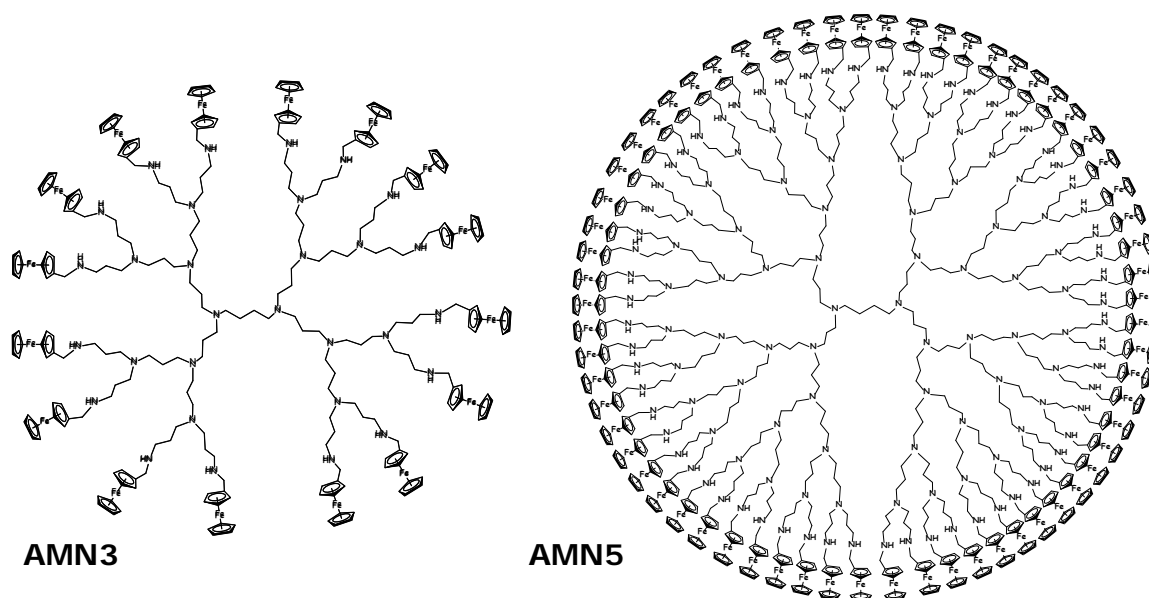


Figura 1.4. Dendrímeros de tercera y quinta generación funcionalizados con grupos aminoferroceno

1.2.6. POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS

Los polímeros hiperramificados son arquitecturas poliméricas consideradas estructuras dendríticas. Al igual que los dendrones y los dendrímeros, son estructuras altamente ramificadas, pero a diferencia de éstos, su estructura no es regular ni simétrica, sino que son moléculas ramificadas al azar.²⁸ Mientras que los dendrímeros se obtienen a través de un crecimiento secuencial cuidadoso y laborioso, los polímeros hiperramificados se obtienen generalmente en una sola etapa mediante policondensación de los monómeros implicados en la reacción.

A pesar de que la arquitectura tridimensional de los dendrímeros y de los polímeros hiperramificados puede parecer similar a primera vista, encontramos algunas diferencias importantes.²⁹ Un dendrímero tiene una estructura bien definida y consta de dos tipos de unidades estructurales, las unidades

terminales en la superficie globular y las unidades dendríticas en el interior, mientras que un polímero hiperramificado tiene una estructura irregular que contiene tres tipos de unidades estructurales: unidades dendríticas, lineales y terminales. Las unidades terminales están siempre localizadas en los extremos, sin embargo, las unidades dendríticas y las unidades lineales están distribuidas aleatoriamente por la estructura macromolecular.

La presencia de cavidades intramoleculares, su alta solubilidad y la abundancia de grupos funcionales en las unidades lineales y terminales hacen que los polímeros hiperramificados tengan una alta reactividad, lo que los hace particularmente atractivos para su uso en diversos campos como la química supramolecular, biomateriales, materiales híbridos y composites, recubrimientos, adhesivos y sensores.³⁰

Los polímeros hiperramificados funcionalizados con ferroceno³¹ son un gran foco en la investigación actual, debido a que presentan el comportamiento ideal del grupo redox, que a la vez nos permite electrodepositarlo sobre la superficie de electrodos metálicos con una gran estabilidad. Estos polímeros presentan grandes ramificaciones que permiten su uso para la inmovilización de enzimas y la construcción de biosensores.³²

Por ello, en esta tesis se utilizaron dos polímeros hiperramificados funcionalizados con unidades de ferroceno interaccionantes (figura 1.5), PDAMS (polidialilmetilsilano) y PMDUS (polimetildiundecenilsilano) que habían demostrado una gran eficiencia electrocatalítica de la reacción de oxidación de NADH.

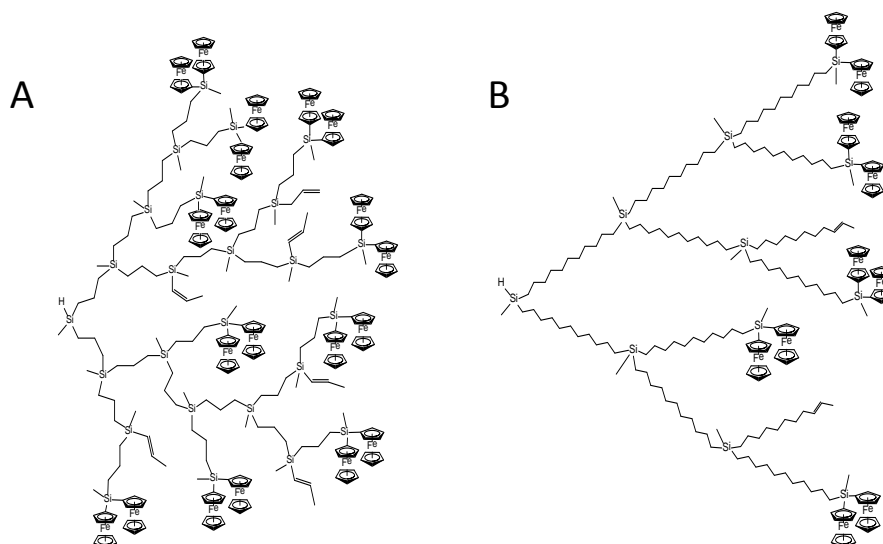


Figura 1.5. Estructura de los polímeros hiperramificados **PDAMS** (A) y **PMDUS** (B).

1.2.7. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Durante los primeros años del siglo XXI se ha producido un crecimiento exponencial en la investigación y el número de publicaciones en el campo de las aplicaciones de las nanopartículas metálicas.

Es bien sabido que las nanopartículas de platino (PtNPs) depositadas sobre electrodos constituyen un material único por su estabilidad y características, y las propiedades de los depósitos electrolíticos de Pt sobre electrodos de Pt o GC dependen de las condiciones de electrodeposición.³³ Además, las nanopartículas de platino incrementan la superficie electródica aportando una transferencia electrónica con importantes propiedades catalíticas.³⁴

Por otro lado, las nanopartículas de oro (AuNPs) de escala nanométrica poseen propiedades electrónicas y ópticas dependientes de su tamaño, lo cual tiene un gran interés en el campo de la nanociencia y nanotecnología e importantes aplicaciones en catálisis³⁵ y sensores y biosensores.³⁶ Concretamente, AuNPs de diámetros en torno a 2 nm muestran propiedades únicas en comparación con las mayores de 5 nm,³⁷ lo que ha motivado un

enorme interés en el diseño de esqueletos macromoleculares para la síntesis de nanopartículas con tamaños entre 1 y 2 nm.

Una aplicación muy interesante de los dendrímeros es su utilización como plantillas debido a su tamaño y a los huecos formados en su interior. En concreto, se ha demostrado que los dendrímeros son capaces de encapsular y estabilizar nanopartículas metálicas con gran facilidad.³⁸

Las suspensiones de partículas de metales nobles, principalmente oro y platino, exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas y se han convertido en punto de mira para muchos investigadores en campos como catálisis, medicina y síntesis de nuevos materiales.

Las nanopartículas de oro y platino presentan unas propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas y catalíticas dependientes de su tamaño con importantes aplicaciones en el ámbito de los sensores y biosensores.³⁹ Además, presentan baja toxicidad y características muy interesantes en función de su tamaño y su funcionalización con diversos ligandos.

En la bibliografía existen numerosos métodos de preparación de NPs metálicas en los que se detalla su formación, así como su distribución y control de su tamaño y, entre ellos, pueden señalarse los métodos de impregnación,⁴⁰ co-precipitación,⁴¹ microemulsión,⁴² sol-gel,⁴³ deposición-precipitación,⁴⁴ entrecruzamiento,⁴⁵ electroquímicos⁴⁶ y reducción química in situ con ferroceno.⁴⁷ En los procesos físicos, las etapas de formación de NPs consisten en la vaporización de un sustrato y la posterior condensación de los átomos para formar el núcleo inicial que crece por la adición de más átomos y la coalescencia.

En los métodos químicos, la primera etapa se inicia con la reducción de los compuestos metálicos disueltos en soluciones acuosas y no acuosas, en presencia o no de agentes estabilizantes. Después de la reducción, las colisiones de dos o más átomos dan origen a la formación de un cúmulo que podrá crecer dependiendo de las condiciones en que se realice la síntesis. La principal

dificultad de la síntesis química es la producción de NPs con distribución monodispersa de tamaños y formas.

Como métodos electroquímicos de preparación de NPs se utilizan métodos ciclovolтамétricos,⁴⁸ coulombimétricos⁴⁹ y de pulsos de potencial.⁵⁰ La síntesis electroquímica presenta algunas ventajas sobre el resto de métodos debido a la sencillez de las variables de síntesis y a la posibilidad de controlar los fenómenos de nucleación, crecimiento y velocidad de reacción, mediante la modificación del potencial eléctrico, la densidad de corriente, el material base de los electrodos y el electrolito soporte.

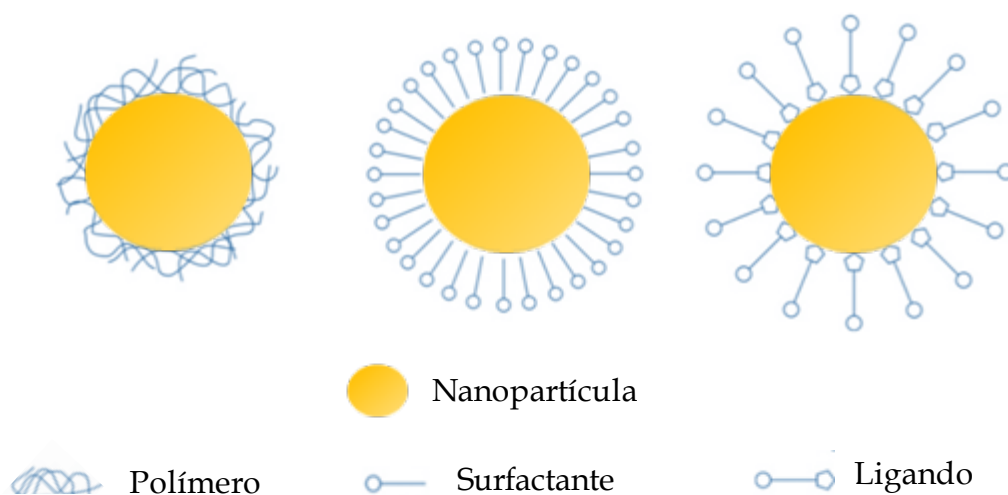


Figura 1.6. Representación de NPs estabilizadas con diferentes agentes.

La comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos en la investigación y obtención de NPs con tamaños pequeños, que oscilan entre los 1-50 nm, debido a que son las más interesantes en cuanto a propiedades se refiere. En 1994, Brust y Schiffrin propusieron la síntesis de AuNPs con tamaños que oscilaban entre 1 - 5 nm mediante su protección por monocapas de alcanotioles (*monolayer protected cluster*, MPC),⁵¹ evitando la aglomeración de las NPs. Tras la publicación del método de Brust-Schiffrin, otros grupos demostraron que el protocolo original era aplicable para alcanotioles con diferentes características,⁵² así como para otro tipo de ligandos que contienen azufre.⁵³

Una alternativa a los MPCs son las nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros (DENS), sintetizados inicialmente por los grupos de Crooks y Esumi a finales de la década de los años 90.⁵⁴ En sus trabajos se describe el uso de dendrímeros como plantilla para la síntesis de NPs coloidales de Cu intradendríticas con una familia de dendrímeros denominados PAMAM (poliamidoaminas) terminados con grupo hidroxilo. Estos estudios demostraron la existencia de nanopartículas de 1.8 nm.

Posteriormente, el mismo grupo comenzó a utilizar Au con otros dendrímeros PAMAM terminados con grupos amino,⁵⁵ encontrando diferencias con los coloides obtenidos con las partículas de Cu²⁺. Al utilizar dendrímeros de generaciones bajas, las partículas de los coloides formados son de mayor tamaño, menos monodispersas y presentan una mayor agregación que las preparadas con dendrímeros más grandes. Este efecto se justificó como consecuencia no solo de la diferencia en el número de aminas terminales de los dos dendrímeros, sino también del tamaño y la forma de los dendrímeros, concluyendo que las generaciones bajas actúan únicamente estabilizando la nanopartícula, al igual que los MCPs.

Más tarde, utilizaron dendrímeros PAMAM terminados con grupos OH, idénticos a los de su primer trabajo con Cu²⁺, observando que el compuesto HAuCl₄ era reducido por los grupos hidroxilo, lo que daba lugar a AuNPs de gran tamaño que no quedaban encapsuladas en el dendrímero.

Según K. Esumi,⁵⁶ la interacción entre AuCl₄⁻ y el esqueleto dendrítico tiene lugar de tres formas:

- a) Mediante la formación de un par iónico entre AuCl₄⁻ y aminas terciarias protonadas.
- b) Mediante la formación de un complejo de coordinación entre una o dos de las aminas terciarias o de los grupos terminales del dendrímero, en su caso esteres metílicos.

- c) Mediante la formación de un complejo de coordinación entre dos aminas terciarias y una amida adyacente, ya que utiliza esqueletos dendríticos PAMAM.

En cualquier caso, parece evidente que las propiedades de los nanocompositos metal-dendrímico dependen de la naturaleza de los grupos terminales, y de ellos depende que se produzca o no la aglomeración y precipitación de clusters grandes o nanopartículas inferiores a 2 nm.

Concretamente, un ejemplo del primer caso son los grupos terminales amina con los que muchos iones metálicos forman complejos cuyo resultado son clusters mayores de 5 nm estabilizados por varios dendrímeros.⁵⁷ En consecuencia, se utilizan dendrímeros funcionalizados con grupos no complejantes en su periferia, como PAMAM-OH. Sin embargo, estos grupos funcionales son buenos agentes reductores que pueden reducir prematuramente los cationes oro y formar también grandes nanopartículas que no están encapsuladas en un solo dendrímico, dificultan la nanodispersión de las partículas de oro y, por otro lado, no son muy reactivos lo que los hace ineficaces para unir las DENs a otras moléculas.

Por estas razones, es preferible utilizar como grupos terminales aminas cuaternarias,⁵⁸ que forman una densidad de carga positiva permanente en la superficie del dendrímico minimizando la probabilidad de agregación y evitando que varios dendrímeros estabilicen una sola nanopartícula.

En 2008, Astruc⁵⁹ comenzó a utilizar dendrímeros funcionalizados con grupos ferroceno como plantilla para la formación de nanopartículas metálicas coloidales, concretamente utilizó dendrímeros que contenían grupos triazol para sintetizar PdNPs.⁶⁰ La formación de AuNPs por el mismo método fracasó en un principio⁶¹ pero más recientemente, el mismo autor ha logrado preparar nanopartículas de oro interdendríticas e intradendríticas de tamaño selectivo en disolución, utilizando metalodendrímicos en tres estados de oxidación con metales que interaccionan electrónicamente.⁶²

Tanto Crooks como Astruc, han detallado la posibilidad de sintetizar dos tipos de NPs en solución coloidal, en función de la generación de los dendrímeros y siempre que se utilicen relaciones adecuadas oro/dendrímtero que permitan la formación de nanopartículas de número de átomos concretos, llamados números mágicos.⁶³ En el caso de dendrímeros de un tamaño pequeño se forman nanopartículas interdendríticas, estabilizándose con distintas moléculas de dendrímtero, mientras que en el caso de generaciones de dendrímtero mayores, se forman nanopartículas intradendríticas de tamaños inferiores a 2 nm y de gran monodispersidad (Figura 1.7).

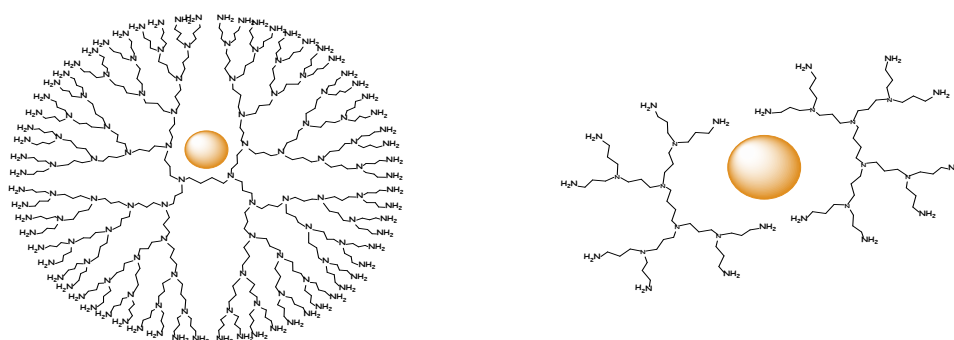


Figura 1.7. Representación de DENs intra e interdendríticas utilizando dendrímeros DAB.

La reacción general descrita en estos trabajos ocurre en medio homogéneo y consta de dos etapas, ambas en el seno de una disolución. En primer lugar, se produce la incorporación de los iones metálicos en el interior de la macromolécula mediante coordinación con los grupos funcionales del interior dendrítico, y seguidamente se produce la reducción química de los iones albergados en el interior para formar átomos metálicos de valencia cero, que posteriormente se reorganizan para dar lugar a la nanopartícula. Esta metodología presenta un gran avance con respecto a los MCPs, ya que las nanopartículas obtenidas son monodispersas y se consiguen NPs intradendríticas inferiores a 2 nm. Además, es posible controlar el tamaño de las NPs fácilmente ajustando la relación metal/dendrímtero.

Con respecto a las posibles aplicaciones como catalizador, lo más habitual es que las nanopartículas deban ser depositadas sobre determinadas superficies, en las que debe mantenerse la dispersión y la estabilidad. En este

sentido, las aportaciones publicadas hasta el momento son la adsorción de las DENs sobre superficies de oro (altamente inestables), por unión covalente a monocapas autoensambladas (a menudo no electroactivas por formación de capas aislantes electrodo-dendrímico),⁶⁴ por inmovilización electroquímica a electrodos de carbono vítreo,⁶⁵ por deposición de la correspondiente disolución de DENs y posterior evaporación del disolvente,⁶⁶ por incorporación a matrices poliméricas conductoras⁶⁴ o a composites de nanotubos de carbono.⁶⁷ Otros autores, como Ping-Ping Fang,⁶⁸ han utilizado dendrímeros adsorbidos sobre superficies de oro o platino y han depositado posteriormente AuNPs coloidales obtenidas por separado previamente con citrato sódico.

Hasta este momento **no se ha conseguido sintetizar *in-situ* nanopartículas metálicas con buena monodispersión utilizando dendrímeros previamente depositados sobre superficies electródicas como plantilla** y, en este sentido, los retos más importantes en éste área siguen siendo el desarrollo de métodos de estabilización de las nanopartículas depositadas en superficies que eviten su agregación, impedir el bloqueo de su superficie activa, manteniendo su eficiencia catalítica y el control de su tamaño y distribución. Por ello este ha sido uno de los objetivos principales de esta tesis.

1.3. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

Las investigaciones realizadas hasta el momento demuestran que la incorporación de NPs metálicas facilita la transferencia electrónica en el electrodo, por lo que se espera que la preparación de nanocomposites que incluyan estas nanopartículas, bien como base de los electrodos modificados o bien obtenidas con dendrímeros con grupos organometálicos electroactivos como plantilla permita obtener superficies catalíticas, sensores y biosensores electroquímicos con mejores respuestas.

Teniendo en cuenta el gran potencial que nos ofrecen los materiales basados en macromoléculas dendríticas de ferroceno y la incorporación de nanopartículas metálicas para las aplicaciones como sensores amperométricos, los **objetivos principales** de esta Tesis han sido:

- Preparación de superficies electródicas modificadas con estructuras dendríticas (dendrimeros y polimeros) previamente sintetizadas y estudio de sus propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas.
- Preparación de electrodos modificados con nanopartículas de platino y depositar sobre ellas los dendrimeros o polimeros ramificados con el objetivo de aumentar la superficie activa del electrodo buscando efecto catalítico sinérgico ferroceno-electrodo y estudio de sus propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas.
- Síntesis de nanopartículas de oro inter e intra-dendríticas utilizando electrodos previamente modificados con tres generaciones de dos familias de dendrimeros, funcionalizados con amidoferroceno y aminoferroceno respectivamente, como plantillas, y estudio de sus propiedades electrocatalíticas.
- Desarrollo y puesta a punto de nuevos catalizadores, sensores y/o biosensores electroquímicos, basados en las nuevas superficies electródicas obtenidas.

De acuerdo con estos objetivos, el **plan de trabajo** fue diseñado y llevado a cabo de la siguiente manera:

1. Síntesis y caracterización de las macromoléculas.

En primer lugar, se seleccionaron los polimeros y dendrimeros a preparar de acuerdo a la experiencia previa adquirida por el grupo de investigación en este tipo de macromoléculas. Se decidió utilizar dos polimeros hiperramificados de carbosilano funcionalizados con ferrocenos interaccionantes y la familia de dendrimeros polipropilamina. Posteriormente, se obtuvieron varias generaciones de estos dendrimeros mediante la funcionalización de los mismos con diferentes derivados de ferroceno y se corroboró su estructura mediante diversas técnicas de caracterización.

Este trabajo fue desarrollado en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid y la caracterización estructural de los dendrímeros se realizó en el Servicio Interdepartamental de Investigación (S.I.d.I.).

2. Preparación de superficies electródicas modificadas con los dendrímeros y polímeros hiperramificados y caracterización electroquímica y cinética de su actividad electrocatalítica y bioelectrocatalítica.

Una vez obtenidas las macromoléculas, se realizó un estudio sistemático de las propiedades electroquímicas y cinéticas de las mismas. Este estudio se compone de las siguientes fases:

- a) Modificación de electrodos de diferentes materiales (oro, platino, y carbono vitrificado) por electrodeposición a potencial controlado o mediante ciclos de potencial y determinación de los parámetros cinéticos macromolécula-electrodo, tanto en disolución como de los electrodos modificados, con el fin de caracterizar sus aptitudes electrocatalíticas.
- b) Preparación de superficies nanoestructuradas por electrodeposición de nanopartículas de platino y posteriormente películas de las correspondientes macromoléculas, y su estudio morfológico y cinético.
- c) Preparación por vía química de nanopartículas de oro inter o intradendríticas con tamaño controlado, utilizando tres generaciones de dos familias de dendrímeros, funcionalizados con amidoferroceno y aminoferroceno respectivamente, y su estudio morfológico y cinético.

3. Aplicaciones de los electrodos desarrollados como catalizadores, sensores y biosensores.

En esta parte del proyecto se han desarrollado las siguientes aplicaciones:

- a) Desarrollo de biosensores amperométricos de NADH con enzimas deshidrogenasas inmovilizadas (alcohol deshidrogenasa), basados en polímeros hiperramificados de carbosilano con ferrocenos comunicados electrónicamente depositados sobre nanopartículas de platino. Se realizó el estudio cinético y la puesta a punto de los métodos analíticos para la detección y determinación cuantitativa de etanol y metanol frente a las que han demostrado ser eficaces electrocatalizadores.
- b) Desarrollo de un sensor de paracetamol basado en amidoferrocenildendrimeros electrodepositados sobre nanopartículas de platino. Se realizó el estudio cinético y la puesta a punto del método analítico para la detección y determinación cuantitativa de paracetamol en presencia de interferentes y en muestras reales.
- c) Desarrollo de un eficaz electrocatalizador para la reacción de reducción de oxígeno (ORR) basado en AuNPs de tamaños inferiores a 2 nm, obtenidas con amidoferrocenildendrimeros de quinta generación. Se realizó el estudio cinético completo.
- d) Desarrollo de un sensor de dopamina basado en nanopartículas de oro de tamaño controlado obtenidas mediante plantillas de amidoferrocenildendrimeros de primera generación. Se realizó el estudio cinético y la puesta a punto del método analítico para la detección y determinación cuantitativa de dopamina en presencia de interferentes y en muestras reales.
- e) Desarrollo de un catalizador tanto de la oxidación como de la reducción de peróxido de hidrógeno basado en nanopartículas de oro de tamaño controlado obtenidas mediante plantillas de

aminoferrocenildendrimeros de distintas generaciones. Se realizó el estudio cinético y la puesta a punto del sensor para la detección y determinación cuantitativa de peróxido de hidrógeno.

1.4. APORTACIONES ORIGINALES DEL AUTOR

A lo largo del desarrollo de esta tesis se han realizado las siguientes aportaciones originales, listadas por orden de relevancia:

- 1- Se han preparado por primera vez AuNPs encapsuladas en dendrimeros en medio heterogéneo, es decir, utilizando los dendrimeros como plantilla inmovilizados como una película sobre la superficie de un electrodo metálico, fijando las nanopartículas introduciendo los electrodos modificados en una disolución que contenía ácido tetracloroaurico.
- 2- Se han desarrollado nuevas superficies electródicas nanoestructuradas de preparación sencilla con propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas excelentes.
- 3- Se han desarrollado y puesto a punto nuevos catalizadores y dispositivos sensores y biosensores a partir de las nuevas superficies electródicas desarrolladas que mejoran otros más complejos existentes.
- 4- Se han desarrollado sensores de paracetamol que han mostrado excelentes resultados frente a los descritos en la bibliografía, permitiendo su detección en muestras reales que incluso presentan a uno de sus mayores interferentes como es el ácido ascórbico.
- 5- Se han desarrollado sensores de dopamina que han mostrado excelentes resultados frente a los descritos en la bibliografía, permitiendo su detección una muestra real de orina humana y en un preparado farmacéutico.

- 6- Se han desarrollado biosensores de NADH que han mostrado excelentes resultados frente a los descritos en la bibliografía, y con las posterior modificación con alcohol deshidrogenasa se han fabricado biosensores de alcohol que presentan una mejor respuesta frente al metanol que frente al etanol, siendo esto opuesto a lo descrito en la mayoría de los biosensores de alcohol descritos en la bibliografía.

1.5. REFERENCIAS

-
1. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*; 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2001
 2. Valcárcel, M.; Cárdenas, M. S. *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*; Springer-Verlag Ibérica: Barcelona, España, 2000.
 3. Clark, L. C., Jr.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29.
 4. (a) Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747 (b) Karyakin, A.A.; Gitelmacher, O.V.; Karyakina, E.E. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2419.
 5. (a) Wang, B.; Li, B.; Deng, Q.; Dong, S.; *Anal. Chem.* 1998, *70*, 3170. (b) Senel, M.; Abasiyanikb, M.F. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 1765. (c) Liu, Z.; Cardosi, M.; Rodgers, J.; Lillie, G.; Simpson, L. *Reactive and Functional Polymers*, **2010**, *70*, 715. (d) Qiua, J.D.; Lianga, R.; Wang, R.; Fana, L.; Chena, Y.; Xiab, X. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *25*, 852.
 6. (a) Zhou, K.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 259. (b) Scampicchio, M.; Arecchi, A.; Bianco, A.; Bulbarello, A.; Bertarelli, C.; Mannino, S. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 1056. (c) Yang, M.H.; Choi, B.G.; Park, H.; Hong, W.H.; Lee, S.Y.; Park, T.J. *Electroanalysis*, **2010**, *22*, 1223. (d) Li, Y.; Wei, Y.; Shi, G.; Xian, Y.; Jin, L. *Electroanalysis*, **2011**, *23*, 497. (e) Zhou, K.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Electroanalysis*, **2011**, *23*, 862. (f) Han, X.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Microchim. Acta* **2010**, *171*, 233. (g) Han, X.; Zhu, Y.; Yang, X.; Zhang, J.; Li, C. *J. Solid State Electrochem.* **2011**, *15*, 511.
 7. Alegret, S.; del Valle, M.; Merkoçi, A. *Sensores Electroquímicos: Introducción a los Quimiosensores y Biosensores*; Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona, España, 2004.
 8. (a) Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; Wiley-VCH: New Jersey, USA, 2006. (b) Gorton, L. *Electroanalysis* **1995**, *7*, 23. (c) Armada, M.P.G.; Losada, J.; Zamora, M.; Alonso, B.; Cuadrado, I.; Casado, C.M. *Bioelectrochem.* **2006**, *69*, 65. (d) Losada, J.; Zamora, M.; García Armada, P.; Cuadrado, I.; Alonso, B.; Casado, C.M. *Anal. and Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 1209. (e) Alonso, B.; García Armada, P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; González, B.; Casado, C.M. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *19*, 1617. (f) García Armada, M.P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Alonso, B.;

- González, B.; Casado, C.M.; Zhang, J. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **2004**, *101*, 143. (g) García Armada, M.P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Alonso, B.; González, B.; Ramírez-Oliva, E.; Casado, C.M. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **2003**, *88*, 190. (h) GarcíaMartínez, M.; Alonso, B.; Casado, C.M.; Losada, J.; García Armada, M.P. *Electroanalysis*, **2011**, *23* 2888.
9. (a) Astruc, D.; Ornelas, C.; Ruiz, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 841. (b) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857. (c) Heinze, K.; Lang, H. *Organometallics* **2013**, *32*, 5623.
10. (a) Beer, P. D.; Heseck, D.; Chun Nam, K. *Organometallics* **1999**, *18*, 3933. (b) Villoslada, R.; Alonso, B.; Casado, C. M.; García-Armada, P.; Losada, J. *Organometallics* **2009**, *28*, 727. (c) Ornelas, C.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Organometallics* **2009**, *28*, 4431.
11. Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489.
12. (a) García Armada, M. P.; Losada, J.; López-Villanueva, F. J.; Frey, H.; Alonso, B.; Casado, C. M. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 2803.
13. (a) García Armada, M. P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Alonso, B.; González, B.; Ramírez-Oliva, E.; Casado, C. M. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *88*, 190. (b) García Armada, M. P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Alonso, B.; González, B.; Casado, C. M.; Zhang, J. *Sens. Actuators B Chem.* **2004**, *101*, 143.
14. (a) Takada, K.; Díaz, D. J.; Abruña, H. D.; Cuadrado, I.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Morán, M.; Losada, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10763. (b) Cuadrado, I.; Morán, M.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Lobete, F.; García, B.; Ibisate, M.; Losada, J. *Organometallics* **1996**, *15*, 5278. (c) Alonso, B.; Morán, M.; Casado, C. M.; Lobete, F.; Losada, J.; Cuadrado, I. *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 1440. (d) Casado, C. M.; Alonso, B.; Losada, J.; García Armada, M. P. en *Designing Dendrimers*; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2012.
15. Vögtle, F.; Richard, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry. Concepts, Syntheses, Properties, Applications*; Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2009.
16. (a) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryde, J.; Smith, P. *Polym, J.* **1985**, *17*, 117. (b) Newkome, G. R.; Yao, Z-Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
17. Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.
18. Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 155.
19. De Brander, E. M. M.; Berg, V.; Meijer, E. W. *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1370.
20. (a) Newkome, G. R.; Moorefield, C. N., Vögtle, F. *Dendrimers and dendrons. Concept, Synthesis and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001. (b) Tomalia, D.

- A.; Frechet, J. M. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 217. (c) Vögtle, F.; Gestermanm, S.; Hesse, R.; Schwierz, H.; Windisch. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 987. (d) Frechet, J. M., Tomalia, D. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, John Wiley & Sons, Chichester, 2001. (e) Newkome, G. R. *Advances in Dendritic Macromolecules*, Vol. 1-5, JAI Press, Greenwich, 1994, 1995, 1996, 1999, 2002. (f) Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.
21. González, B.; Cuadrado, I.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Pastor, C.J. *Organometallics* **2000**, *19*, 5518.
22. González, B.; Alonso, B.; Losada, J.; García-Armada, M. P.; Casado, C. M. *Organometallics* **2006**, *25*, 3558.
23. Zamora, M.; Herrero, S.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Casado, C. M.; Alonso, B. *Organometallics* **2007**, *26*, 2688.
24. (a) Togni, A.; Hayashi, T.; Eds. *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1995. (b) Astruc, D. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 383.
25. (a) Djeda, R.; Rapakousiou, A.; Liang, L.; Guidolin, N; Ruiz, J.; Astruc, D. *Angew. Chem. Int.* **2010**, *49*, 8152. (b) Diallo, A. K.; Menuel, S.; Monflier, E.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4617.
26. Villena, C.; Losada, J.; García Armada, P.; Casado, C. M.; Alonso, B. *Organometallics* **2012**, *8*, 3284.
27. Salmon, A.; Jutzi, P. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *595*, 637.
28. Fréchet, J. M. *Science* **1994**, *263*, 1710.
29. Caminade, A. -M.; Yan. D.; Smith. D. K. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3870.
30. Zheng, Y.; Li, S.; Weng. Z.; Gao. C. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4091.
31. Whittell, G. R.; Manners, I. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3439.
32. (a) Svobodová, L.; Snejdárková, M.; Tóth, K.; Gyurcsanyi, R. E.; Hianik, T. *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 285. (b) Klajnert, B.; Sadowska, M.; Bryszewska, M. *Bioelectrochemistry* **2004**, *65*, 23.
33. (a) Petrii, O. A.; Tsirlina, G. A.; Pron'kin, S. N.; Spiridonov, F. M.; Khrushcheva, M. L. *Russ. J. Electrochem.* **1999**, *35*, 8. (b) Yasin, H. M.; Denuault, G.; Pletcher, D. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *633*, 327. (c) Huang, T.; Jiang, R.; Zhang, D.; Zhuang, J.; Cai, W.; Yu, A. *J. Solid State Electrochem.* **2010**, *14*, 101.
34. (a) Bas, S.Z.; Gülce, H.; Yıldız, S. *J. Mol. Catal. B: Enzyme* **2011**, *72*, 282. (b) Losada, J.; García Armada, M. P. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1406.

-
35. (a) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293. (b) Stratakis, M.; Garcia, H. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4469. (c) Mitsudome, T.; Kaneda, K. *Green Chem.* **2013**, *15*, 2636. (d) Cuenya, B. R. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1682. (e) Takale, B. S.; Bao, M.; Yamamoto, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2005. (f) Zhou, X.; Xu, W.; Liu, G.; Panda, D.; Chen, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 138.
36. (a) Pingarrón, J.M.; Yañez-Sedeño, P.; Gonzalez-Cortes, A. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5848. (b) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 63. (c) Zhu, C.; Yang, G.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 230. (d) Moakhara, R. S.; Goh, G. K. L.; Dolatia, A.; Ghorbani, M. *Appl. Catal. B-Environ.* **2017**, *201*, 411. (e) Moakhar, R. S.; Goh, G. K. L.; Dolati, A.; Ghorbani, M. *Electrochem. Commun.* **2015**, *61*, 110. (f) Rasheed, P. A.; Sandhyarani, N. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 981.
37. (a) Aikens, C.M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 99. (b) Jin, R. *Nanoscale* **2010**, *2*, 343.
38. (a) Zhao, M.; Sun, L.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4877. (b) Garcia, M. E.; Baker, L. A.; Crooks, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 256. Astruc, D. (c) Ornelas, C.; Ruiz, J., *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 841.
39. Rapakousiou, A.; Djeda, R., Grillaud, M.; Li, N.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Organometallics* **2014**, *33*, 6953.
40. Mu, X.-D.; Evans, D. G.; Kou, Y. *Catal. Lett.* **2004**, *97*, 151.
41. Claus, P.; Brückner, A.; Mohr, C.; Hofmeister, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11430.
42. Papp, S.; Dekany, I. *Colloid Polym. Sci.* **2001**, *279*, 449.
43. Martino, A.; Yamanaka, S. A.; Kawola, J. S.; Ly, D. A. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 423.
44. Kozlov, A. -I.; Kozlova, A. P.; Asakura, K.; Matsui, Y.; Kogure, T.; Shido, T.; Iwazawa, Y. *J. Catal.* **2000**, *196*, 56.
45. Andres, R. P.; Bielefeld J.-D.; Henderson, J.-I.; Janes, D.-B.; Kolagunta, V.-R.; Kubink, C.-P.; Mahoney, W.; Osifchin, R.-G.; Reifenberger, R. *Science* **1996**, *273*, 1690.
46. Wu, K. T.; Yao, Y. D.; Wang, C. R. C.; Chen, P. F.; Yeh, E. T. *J. Appl. Phys.* **1999**, *85*, 5959.
47. Bas, S. Z.; Gülce, H.; Yıldız, S.; Gülce, A. *Talanta* **2011**, *87*, 189.
48. (a) Gong, J.; Wang, L.; Zhang, L. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2285. (b) Babu, T. G. S.; Varadarajan, D.; Murugan, G.; Ramachandran, T.; Nair, B. G.; *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42*, 427. (c) Wan, Q.; Song, H.; Shu, H.; Wang, Z.; Zou, J.;

- Yang, N. *Colloids Surf., B.* **2013**, *104*, 181. (d) Li, J.; Xie, H.; Chen, L. *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *153*, 239. (e) Wang, D.; Dou, W.; Zhao, G.; Chen, Y. *J. Microbiol. Methods* **2014**, *106*, 110.
49. Mena, M. L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 20.
50. Qiu, C.; Chen, T.; Wang, X.; Li, Y.; Ma, H. *Colloids Surf. B.* **2013**, *103*, 129.
51. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. J. *Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1994**, 801.
52. (a) Terrill, R. H.; Postlethwaite, T. A.; Chen, C. H.; Poon, C. D.; Terzis, A.; Chen, A. D.; Hutchison, J. E.; Clark, M. R.; Wignall, G.; Londono, J. D.; Superfine, R.; Falvo, M.; Johnson, C. S.; Samulski, E. T.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12537. (b) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. *Langmuir* **1998**, *14*, 17. (c) Johnson, S. R.; Evans, S. D.; Brydson, R. *Langmuir* **1998**, *14*, 6639. (d) Porter, L. A.; Ji, D.; Westcott, S. L.; Graupe, M.; Czernuszewicz, R. S.; Halas, N. J.; Lee, T. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 7378.
53. (a) Schaaff, T. G.; Knight, G.; Shafiqullin, M. N.; Borkman, R. F.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10643. (b) Templeton, A. C.; Chen, S. W.; Gross, S. M.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 66. (c) Wuelfing, W. P.; Gross, S. M.; Miles, D. T.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12696. (d) Chen, S. W.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 682. (e) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. J. *Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655. (f) Chen, S. H.; Kimura, K. *Langmuir* **1999**, *15*, 1075. (g) Johnson, S. R.; Evans, S. D.; Mahon, S. W.; Ulman, A. *Langmuir* **1997**, *13*, 51. (h) Buining, P. A.; Humbel, B. M.; Philipse, A. P.; Verkleij, A. J. *Langmuir* **1997**, *13*, 3921.
54. Zhao, M.; Sun, L.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4877.
55. Garcia, M. E.; Baker, L.A.; Crooks, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 256.
56. Torigoe, K.; Suzuki, A.; Esumi, K. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *241*, 346
57. Oh, S.-K.; Kim, Y.-G.; Ye, b.H.; Crooks, R.M. *Langmuir* **2003**, *19*, 10420.
58. Kim, Y.-G.; Oh, S.-K.; Crooks, R.M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 167.
59. Astruc, D.; Ornelas, C.; Ruiz, J., *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 841.
60. (a) Ornelas, C.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Chem. Commun.* **2007**, 4946. (b) Ornelas, C.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2010**, *20*, 503. (c) Ornelas, C.; Ruiz, J.; Salmon, L.; Astruc. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 837.

-
61. (a) Boisselier, E.; Diallo, A. K.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Chem. Commun.* **2008**, 4819. (b) Boisselier, E.; Diallo, A. K.; Salmon, L.; Ornelas, C.; J. Ruiz, J.; Astruc, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2729.
62. Wang, Y.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3489.
63. Brack, M. *Sci. Am.* **1997**, *277*, 50.
64. Scott, R.W.J.; Wilson, O.M.; Crooks, R.M. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 692.
65. (a) Ye, H.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4930. (b). Yancey, D. F.; Carino, E. V.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10988.
66. Bernechea, M.; García-Rodríguez, S.; Terreros, P.; De Jesús, Fierro, E. J. L. G.; Rojas, S. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 1287.
67. X. Lu and T. Imae, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2416.
68. Fang, P., -P.; Buriez, O.; Labbé, E.; Tian, Z. -Q.; Amatore, C. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *659*, 76.

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación, se exponen los principales resultados obtenidos y presentados en los artículos que integran esta tesis doctoral.

2.1. NANOPARTÍCULAS DE PLATINO COMO BASE NANOESTRUCTURADA PARA LA DEPOSICIÓN DE DENDRÍMEROS Y POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS

Con objeto de mejorar las propiedades cinéticas y analíticas de electrodos modificados con macromoléculas dendríticas, y en base a la bibliografía,¹ nos propusimos preparar nuevos electrodos modificados con nanopartículas metálicas (Pt) que pudieran ser eficientes sensores o biosensores de diferentes analitos, mejorando los resultados obtenidos hasta el momento. Las nanopartículas de platino (PtNPs) se prepararon mediante electrodeposición aplicando 20 ciclos de potencial a un electrodo base de platino en una disolución de hexacloroplatinato (IV) de potasio en el rango de potencial de -0.25 a 0.6 V (vs. SCE) a una velocidad de barrido de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.²

Las superficies formadas se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La figura 2.1 muestra una de las micrografías obtenidas, a partir de las que se estimó un tamaño de 90 nm de las PtNPs. El área efectiva de estos electrodos de PtNPs/Pt se calculó por integración del área bajo el pico de la desorción del hidrogeno, medido en H_2SO_4 0.5 M y considerando el valor más aceptado de una carga de $210 \mu\text{C}$ por cm^2 de Pt policristalino.³

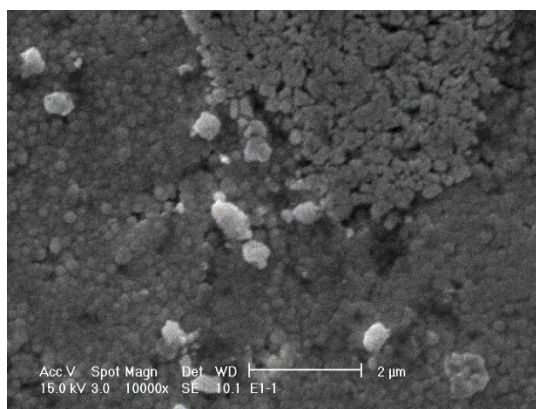


Figura 2.1. Micrografía de SEM (2 μm) de un hilo de Pt modificado con PtNPs electrodepositadas.

2.1.1. PREPARACIÓN Y ESTUDIO DE LOS ELECTRODOS

La preparación de los electrodos modificados con polímeros o dendrímeros siguió un esquema común, que se esquematiza en la figura 2.2. La fase de deposición de las correspondientes macromoléculas se realizó bajo control potencioestático o mediante ciclos de potencial, no observando diferencias entre ambos métodos.

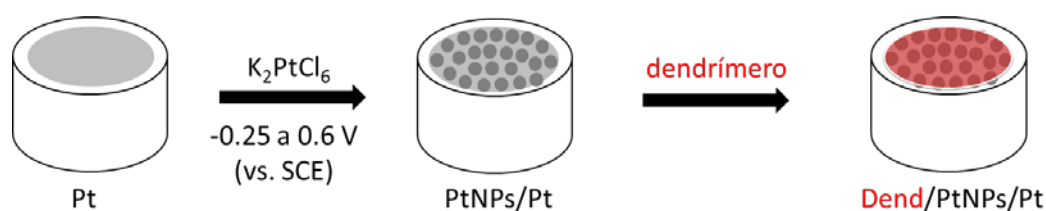


Figura 2.2. Preparación de los electrodos de Pt modificados con PtNPs y dendrímeros.

2.1.2. ELECTRODOS BASADOS EN POLÍMEROS CARBOSILANO FUNCIONALIZADOS CON FERROCENOS INTERACCIONANTES DEPOSITADOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO.

En primer lugar, se utilizaron los dos polímeros dendríticos hiperramificados funcionalizados con unidades de ferroceno interaccionantes **PDAMS** (polidialilmetilsilano) y **PMDUS** (polimetildiundecenilsilano), anteriormente descritos en la introducción. Una vez preparados los electrodos modificados con PtNPs, se procedió a depositar las macromoléculas PDAMS y PMDUS a partir de sendas disoluciones de estos polímeros 10^{-4} M en la especie redox activa (ferroceno) y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0.1 M en diclorometano, manteniendo constante el potencial a 0.7 V (vs. Ag/AgCl).⁴

La morfología de las películas de **PDAMS** y **PMDUS** (figura 2.3) electrodepositadas sobre platino es algo diferente. La película de **PDAMS** (izquierda) es más rugosa, mientras que la de **PMDUS** forma un depósito de material compacto, liso, homogéneo y denso.

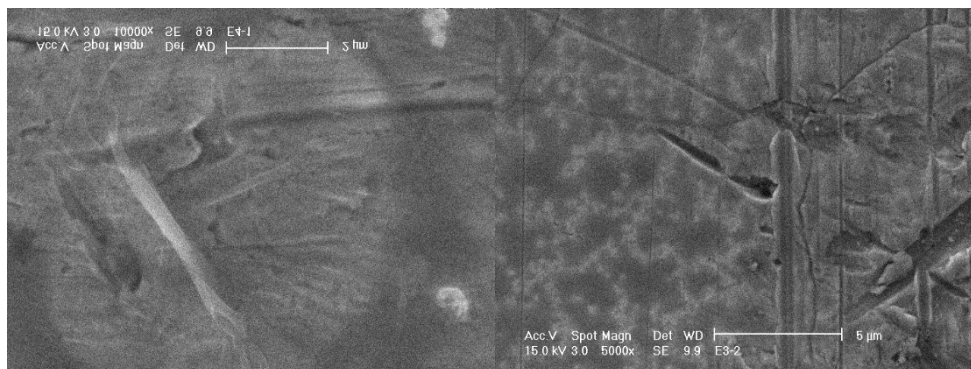


Figura 2.3. Micrografía de SEM (2 μm) de hilos de Pt modificados con PDAMS (izquierda) y PMDUS (derecha).^{4(a)}

Sin embargo, las películas depositadas de ambas macromoléculas sobre los electrodos PtNPs/Pt son muy compactas, cubriendo toda la superficie de las nanopartículas, formando una superficie nanoestructurada uniforme, como puede apreciar en la figura 2.4.

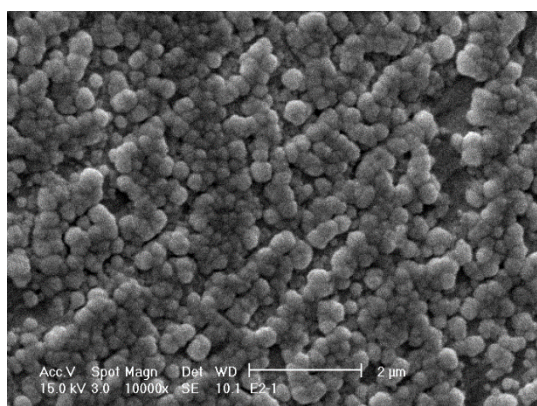


Figura 2.4. Micrografía de SEM (2 μm) de hilo de Pt modificado con polímero PMDUS depositado sobre PtNPs.

Se estudió el comportamiento cinético de ambos electrodos modificados observando una dependencia lineal entre la intensidad de pico y la velocidad de barrido a velocidades inferiores a $0.2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, indicativa de una especie electroactiva inmovilizada sobre la superficie del electrodo.

El estudio cinético de estos electrodos muestra que las corrientes de pico anódica y catódica varían linealmente con la velocidad de barrido para velocidades inferiores a $0.2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, de acuerdo con el comportamiento de grupos electroactivos confinados en la superficie del electrodo. Las separaciones de los

potenciales de pico aumentan con el logaritmo de la velocidad de barrido originando líneas rectas, indicando la existencia de limitaciones cinéticas para la transferencia de carga. Mediante la aplicación del modelo de Laviron⁵ se calcularon las constantes cinéticas de transferencia electrónica (k_s) entre los electrodos y los grupos electroactivos de las especies depositadas, observando que la inclusión de nanopartículas en los electrodos modificados aporta al electrodo una gran capacidad para promover la transferencia electrónica desde la superficie del electrodo hasta la última capa de la película.

2.1.3. ELECTRODOS BASADOS EN DENDRÍMEROS CON ESQUELETO DAB FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS AMIDOFERROCENO DEPOSITADOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO.

En esta parte de la investigación se utilizaron dendrímeros DAB-1-(NHCOFc)₄ (**AMD1**), DAB-3-(NHCOFc)₁₆ (**AMD3**) y DAB-5-(NHCOFc)₆₄ (**AMD5**), que fueron sintetizados de acuerdo a procedimientos ya descritos con anterioridad,⁶ y se depositaron sobre electrodos de Pt y electrodos con PtNPs/Pt a partir de disoluciones de las correspondientes macromoléculas en diclorometano, con hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0.1 M como electrolito soporte, manteniendo constante el potencial a 1.0 V (vs. Ag/Ag⁺).

La figura 2.5 muestra las micrografías de las películas obtenidas sin y con PtNPs y puede observarse que las películas de los dendrímeros son también muy compactas, aumentando la densidad y homogeneidad al aumentar la generación. En la serie de micrografías de los electrodos con PtNPs se observa cómo el dendrímero cubre totalmente las nanopartículas metálicas en todos los casos ofreciendo una superficie similar a la de los polímeros anteriores.

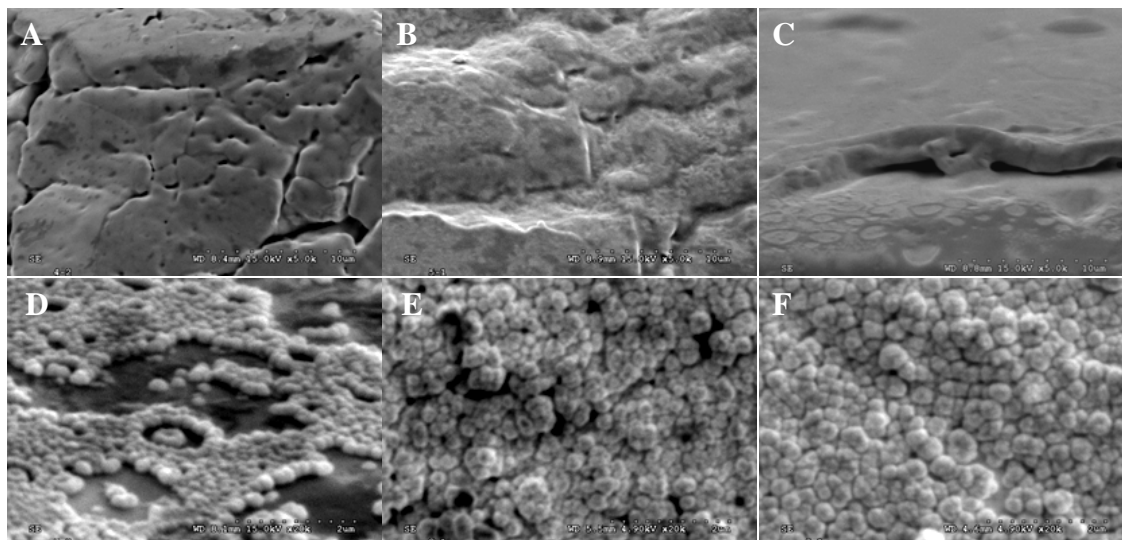


Figura 2.5. Micrografías SEM de electrodos de hilo de Pt modificados con **AMD1** (A), **AMD3** (B) y **AMD5** (C) y **PtNPs/AMD1** (D), **PtNPs/AMD3** (E) y **PtNPs/AMD5** (F).

Una vez se caracterizaron estructuralmente los electrodos, se realizó el estudio electroquímico y cinético de los electrodos de Pt modificados tanto con los dendrímeros, como con PtNPs y dendrímero, observándose un gran aumento de los picos de los electrodos con PtNPs y dendrímero, debido al aumento de superficie efectiva. Hay que hacer notar que se obtiene un muy buen contacto entre ferroceno y NPs y entre grupos ferroceno.

Al estudiar el comportamiento electroquímico de las películas con distintos recubrimientos, se observa en todos los casos un aumento de la intensidad de pico al aumentar el grosor de las películas, lo que nos indica que los electrones tienen capacidad para llegar a las últimas capas de película independientemente de su espesor.

Estas nuevas superficies muestran un comportamiento electroquímico completamente diferente a los polímeros **PDAMS** y **PMDUS** estudiados anteriormente. En este caso, para todos los electrodos preparados, se observa que ΔE_p prácticamente no varía al aumentar la velocidad de barrido, aunque es mayor que cero, lo que indica ausencia de limitaciones cinéticas. Los valores encontrados son muy cercanos al de un sistema reversible en disolución homogénea ($0.058/n$), en el caso de los electrodos modificados con los

dendrimeros, y algo superior para los electrodos con nanopartículas, debido probablemente a la heterogeneidad de la superficie que aportan las nanopartículas. Por otro lado, las anchuras de semipico obtenidas son ligeramente diferentes al valor teórico de Nernst de $90.6/n$, debido a que la oxidación en la primera capa, que es la que controla la reacción en el interior de la película, se hace más dispersa a lo largo del eje de potenciales.⁷ La mayor anchura de los picos se asocia con interacciones repulsivas, mientras que el estrechamiento, solamente observado en el electrodo **PtNPs/AMD5**, se asocia con interacciones atractivas. Se aprecia una disminución de las interacciones repulsivas en los **PtNPs/Dend** electrodos y entre ellos al aumentar la generación de dendrímico.

Todos estos electrodos modificados muestran linealidad entre las intensidades de pico y la velocidad de barrido para velocidades por encima de $0.2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Pero en estas películas se observa un cambio de comportamiento para velocidades de barrido superiores a $1.0 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, a partir de la cual, en lugar de tener dependencia lineal de i_p vs. V , pasan a tenerla vs $v^{1/2}$, lo que indica una interacción entre la velocidad de barrido y la cinética de la transferencia de carga a través de la película.⁸ En estos casos, i_p puede ser expresada por la misma ecuación utilizada para las especies en disolución (ecuación de Randles–Sevcik), que permite calcular un coeficiente de difusión aparente, D_{ct} , también llamado coeficiente de transporte de carga por difusión o coeficiente de difusión efectivo.

La obtención de estos coeficientes de difusión aparentes nos demostró que los electrodos con nanopartículas de platino, además de ofrecer mayor área de contacto, mejoran la transferencia electrónica, ya que se produce un aumento de los mismos con respecto a las películas sin PtNPs.

2.1.4. APLICACIONES DE LAS SUPERFICIES ELECTRÓDICAS PREPARADAS

A la vista de sus diferentes propiedades estructurales, de funcionalización y catalíticas se ensayaron diferentes aplicaciones para cada tipo de electrodo.

De acuerdo con la experiencia anterior de este grupo, como ya se ha citado, se utilizaron los electrodos modificados con polímeros carbosilano hiperramificados para la determinación de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) con el fin de obtener buena sensibilidad evitando el envenenamiento de los electrodos. Estos polímeros han sido ya utilizados para inmovilizar una enzima oxidasa,^{4(a)} por lo que se contempló la posibilidad de preparar un biosensor con una enzima deshidrogenasa, en caso de alcanzar el primer objetivo fijado.

Las películas preparadas con dendrímeros sobre PtNPs se ensayaron como sensores de varias moléculas de interés biológico, encontrando mayor afinidad por la molécula de paracetamol, por lo que se desarrolló este sensor.

2.1.5. APLICACIÓN COMO BIOSENSORES NADH Y ALCOHOLES DE LOS ELECTRODOS BASADOS EN POLÍMEROS CARBOSILANO FUNCIONALIZADOS CON FERROCENOS INTERACCIONANTES DEPOSITADOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO.

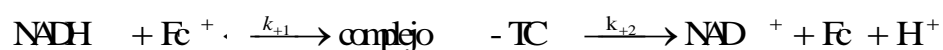
La experiencia previa del grupo de investigación con estructuras dendríticas que contienen unidades de ferroceno electrónicamente comunicadas demuestra que estas macromoléculas pueden ser muy útiles para la fabricación de biosensores que requieran la transferencia simultánea de dos electrones, como por ejemplo, biosensores con enzimas deshidrogenasas dependientes del cofactor NADH.⁹

La molécula de NAD⁺ es un importante cofactor del metabolismo celular involucrado en cientos de reacciones de enzimas redox deshidrogenasas. Estas enzimas catalizan la oxidación de numerosos sustratos con importancia médica,

química o biológica, como por ejemplo el etanol o ácido láctico. Además, desempeña un papel clave en la producción de energía celular y estimula la producción de dopamina.

La transformación de NAD^+ en su forma reducida, NADH , ocurre a través de la transferencia secuencial de dos electrones y un protón. La oxidación directa del NADH sobre superficies de electrodos convencionales requiere elevados sobrepotenciales y a menudo ocasiona el envenenamiento de la superficie electródica por adsorción de los productos de reacción. Con el fin de reducir estos efectos, nos propusimos diseñar nuevos electrodos modificados que pudiesen actuar como mediadores de la oxidación directa de NADH , disminuyendo el potencial de trabajo, y evitar el envenenamiento de los electrodos.

En primer lugar, se confirmó que la oxidación de NADH no producía ninguna alteración ni envenenamiento en las películas, con lo que se alcanzaba uno de los hitos más importantes. A continuación se realizó el estudio cinético, mediante electrodo rotatorio de disco, de estos electrodos como catalizadores de la reacción de oxidación de NADH . Este estudio nos confirmó que la transferencia que se producía era bielectrónica, a la vez que nos permitió corroborar y estudiar la formación de un complejo intermedio de transferencia de carga (complejo - TC) en la reacción entre el mediador de ferroceno y el NADH ,¹⁰ seguido de la formación de productos de reacción. El mecanismo cinético de reacción es similar al de Michaelis–Menten donde la constante de velocidad de la reacción (k_{obs}) puede expresarse como se muestra en la ecuación.



$$k_{\text{obs}} = \frac{K_{+2}}{K_M + [\text{NADH}]}$$

En la tabla 2.1 se muestran los valores obtenidos para las constantes cinéticas. En ellos se puede observar que los valores de k_{obs} no muestran una gran mejora con la modificación de PtNPs, sin embargo en el caso de K_{+2} se observa un importante aumento de la constante indicando que la segunda etapa es más rápida debido al efecto sinérgico entre las PtNPs y los grupos ferroceno. Por otro lado, la constante aparente de Michaelis–Menten (K_M) aumenta del mismo modo que K_{+2} lo que indica que existe limitación de difusión a través de las películas, lo que permite obtener amplios rangos lineales para la medida de la concentración de NADH.

Tabla 2.1. Estudio cinético de la oxidación del NADH.

	PDAMS/Pt	PDAMS/PtNPs/Pt	PMDUS/Pt	PMDUS/PtNPs/Pt
K_{obs} (10^3) ($M^{-1} s^{-1}$)	3.6	4.8	3.6	4.1
k_{+2} (s^{-1})	19.6	42.8	21.6	65.4
K_M (mM)	5.4	8.9	6.0	16.0

Tras finalizar el estudio cinético de la reacción de oxidación del NADH se estudiaron las propiedades analíticas de los sensores mediante cronoamperometría, midiendo sucesivas adiciones de 0.10 mM de NADH a potencial aplicado de 0.5 V (vs. SCE). En la tabla 2.2 se recogen los resultados del estudio de los cuatro sensores y se observa como los sensores con PtNPs muestran mejor respuesta y un mayor rango lineal, de acuerdo con lo observado en el estudio cinético. Los electrodos se almacenaron durante dos meses sin apreciar deterioro ni pérdida de actividad.

Tabla 2.2. Estudio analítico de la detección de NADH.

Electrodos	Rango lineal (μM)	R	Sensibilidad ($mA M cm^{-2}$)	LD (μM)
PDAMS/Pt	70–400	0.9925	15.86	1.56
	400–900	0.9915	6.76	
PDAMS/PtNPs/Pt	87–700	0.9970	68.24	4.78
	700–2500	0.9979	42.57	
PMDUS/Pt	0–300	0.9995	1.32	56.17
	300–1600	0.9990	1.06	
PMDUS/PtNPs/Pt	0–800	0.9985	40.21	6.18
	800–2100	0.9984	24.73	

De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos polímeros muestran buena sensibilidad y amplios rangos lineales, importantes para el desarrollo de biosensores con enzimas deshidrogenasas inmovilizadas. En principio los sensores deben servir para cualquier enzima deshidrogenasa, por lo que queda abierta una línea de investigación con otras enzimas.

Para la selección de la enzima se tuvo en cuenta que una de las principales aplicaciones de biosensores basados en deshidrogenasas es la determinación de alcohol, usando alcohol deshidrogenasa (ADH). La enzima ADH es habitualmente utilizada para la determinación de etanol en el control de procesos de fermentación y para el control de calidad de productos en distintas industrias alimentarias,¹¹ en la determinación clínica de suero y orina, en células de biocombustible metanol, etc. Los métodos clásicos como la refractometría, densitometría o cromatografía de gases son métodos precisos y fiables, pero son muy laboriosos y requieren separaciones previas que consumen gran cantidad de tiempo, y todas estas aplicaciones requieren métodos simples, rápidos y baratos. Para reemplazar estos métodos, se han desarrollado diferentes biosensores basados en enzimas específicas de alcohol, como alcohol deshidrogenasa o alcohol oxidasa, que se aplican para la determinación de alcohol en muestras complejas.¹²

Por estas razones, ADH fue la enzima seleccionada y preparamos un nuevo biosensor incorporando esta enzima inmovilizada mediante la técnica de entrecruzamiento utilizando BSA y glutaraldehído.¹³

La mayoría de los biosensores con ADH publicados están enfocados a la detección de etanol, ya que una gran parte de los autores asumen que el etanol es el mejor sustrato para la ADH. Sin embargo, los nuevos biosensores **ADH/PDAMS/PtNPs** y **ADH/PMDUS/PtNPs** mostraron un sorprendente comportamiento frente a la oxidación de metanol, nunca antes observado para biosensores de ADH, obteniendo una mayor respuesta frente al metanol que frente al etanol. Cada uno de los polímeros hiperramificados tiene un comportamiento distinto debido a su diferente estructura y espesor, junto a la diferente difusión de los alcoholes de diferentes tamaños a través del material

electródico. La diferente morfología de las películas de **PDAMS** y **PMDUS** condiciona la conformación de la enzima, resultando una limitación en el transporte de masa adicional para **PMDUS**. Por otra parte, se ha podido comprobar, mediante el empleo de diferentes alcoholes, cómo la respuesta del biosensor disminuye a medida que aumenta el tamaño de la molécula de alcohol.

Los biosensores de ADH desarrollados en este trabajo exhibieron importantes características cinéticas y analíticas, pero además ofrecen la novedad de medir metanol muy eficientemente a potencial bajo 0.25 V (vs. SCE) a pH neutro.

La discriminación entre metanol y etanol tiene especial importancia para la detección de adulteración de bebidas alcohólicas. En bebidas adulteradas, el metanol se utiliza en lugar de etanol debido a que el metanol es más barato, pero es muy tóxico para los seres humanos. Los biosensores desarrollados miden ambos alcoholes juntos, pero es posible discriminar entre ambos debido a las diferentes pendientes de sus rectas de calibrado a dos diferentes potenciales de trabajo, 0.25 y 0.55 V (vs. SCE), midiendo con el electrodo **ADH/PMDUS/PtNPs**. La tabla 2.3 muestra las rectas obtenidas para ambos alcoholes a dichos potenciales.

Tabla 2.3. Ecuaciones de regresión lineal de calibrado			
E vs. SCE(V)	Alcohol	Ecuación	R
0.25	Metanol	$0.0529x + 0.0879$	0.9981
	Etanol	$0.0182x + 0.0080$	0.9982
0.55	Metanol	$0.0513x + 0.0387$	0.9982
	Etanol	$0.0324x + 0.0216$	0.9992

Estas diferencias permitieron medir cantidades de etanol y metanol (añadido) en muestras reales. El electrodo preparado con el polímero PDAMS no presenta diferencias tan marcadas.

En relación con la influencia de su estructura, los electrodos **ADH/PDAMS/PtNPs** proporcionaron una sensibilidad un poco mejor, mientras

que los **ADH/PMDUS/PtNPs** muestran una respuesta más rápida (2 s vs 60 s) y un límite inferior de detección (80 μM para el metanol) y mejores rangos lineales.

Los nuevos biosensores desarrollados han sido usados para medidas en muestras reales de cerveza sin alcohol y vino tinto, demostrando que pueden llevarse a cabo análisis sencillos sin tratamiento previo de las muestras.

2.1.6. APLICACIÓN COMO SENSORES DE PARACETAMOL DE LOS ELECTRODOS BASADOS EN DENDRÍMEROS CON ESQUELETO DAB FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS AMIDOFERROCENO DEPOSITADOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATINO.

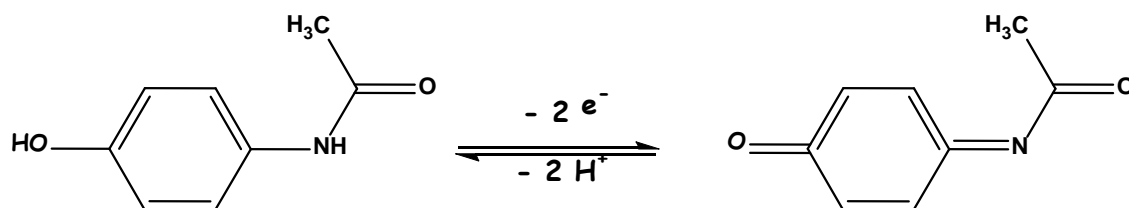
El paracetamol o acetaminofén es uno de los medicamentos más utilizados en la actualidad al ser un medicamento no carcinógeno y un sustituto eficaz de la aspirina como remedio contra la fiebre, cefaleas, reuma, dolores de articulaciones y migrañas. En dosis terapéuticas normales, el paracetamol es rápidamente metabolizado y eliminado por la orina,¹⁴ aunque una sobredosis puede conducir a la acumulación de tóxicos metabólicos, los cuales pueden causar hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.¹⁵ Por lo tanto, es muy importante establecer nuevos métodos de detección rápida de este medicamento en fluidos humanos.

Se han utilizado una gran variedad de técnicas para la determinación de paracetamol como espectrofotometría,¹⁶ volumetría,¹⁷ espectroscopia de fluorescencia,¹⁸ cromatografía¹⁹ y métodos electroquímicos. La última tendencia en la detección de paracetamol es la incorporación de nanopartículas de platino, oro,²⁰ nanotubos de carbono²¹ y composites de Pd/grafeno.²²

Ya se ha citado que los métodos electroquímicos, comparados con el resto de técnicas, presentan la ventaja de su sencillez, su bajo coste y alta sensibilidad, pero la respuesta del paracetamol en electrodos convencionales no es muy buena, lo que limita su uso en análisis. Además, su potencial de oxidación es muy próximo al de otros analitos como el ácido ascórbico u otros,

que suelen estar presentes conjuntamente en algunos medicamentos y causan interferencias.

El paracetamol presenta una reacción de oxidación electroquímica bielectrónica en la que se produce N-acetil-p-quinoidina.²³ Al liberarse dos protones, esta reacción es dependiente del pH.

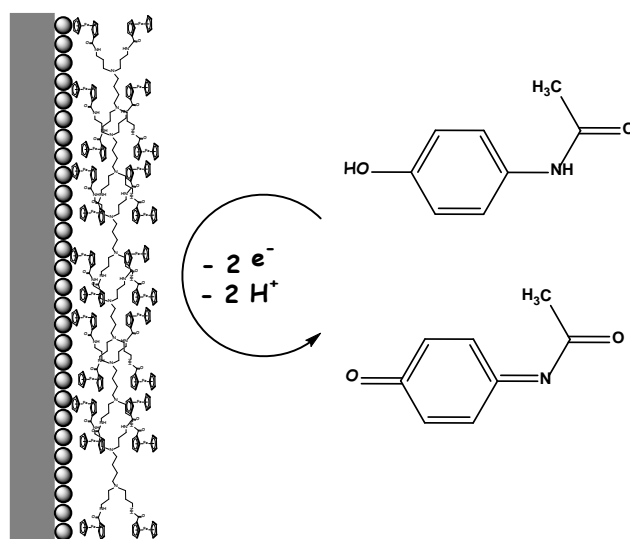


Esquema 2.1. Reacción de oxidación electroquímica del paracetamol.

Al igual que en el caso anterior, otro importante problema de la determinación electroquímica de paracetamol (y ácido ascórbico) con electrodos convencionales es la adsorción de los productos de la oxidación sobre la superficie del electrodo, lo que lleva a una pérdida de selectividad y sensibilidad.²⁴ Esta es la razón que ha llevado a utilizar electrodos modificados para la determinación de paracetamol en presencia de ácido ascórbico.²⁵

Con el fin de reducir estos efectos, nos propusimos diseñar nuevos electrodos modificados que pudiesen actuar como catalizadores de la oxidación directa de paracetamol, disminuyendo el potencial de trabajo, y evitar el envenenamiento de los electrodos por los productos de adsorción y hacerlo inerte frente a sus principales interferentes.

Se estudió la cinética de la reacción de oxidación de paracetamol con electrodos modificados con películas de amidoferrocenildendrímico de las tres generaciones, sin y con PtNPs, mediante electrodo rotatorio de disco para evitar la limitación de la electrolisis por transporte de materia. Se eligieron los electrodos preparados con amidoferrocenilo en lugar de los correspondientes con grupos amina por mostrar los primeros mayor y mejor respuesta a la oxidación de paracetamol.



Esquema 2.2. Reacción de oxidación del paracetamol sobre la superficie de los electrodos.

En este estudio se observó que la oxidación del paracetamol en los electrodos modificados no está completamente controlada por el transporte, pero está parcialmente controlada por la catálisis cinética de la transferencia de electrones. Los coeficientes de difusión obtenidos experimentalmente son mayores que los descritos en la bibliografía para disolución acuosa,²⁶ esto confirma que la cinética de la reacción no está controlada por procesos difusionales, y que la catálisis electroquímica tiene lugar en la superficie del electrodo modificado, donde tiene lugar la reacción de oxidación del paracetamol.

Cabe destacar que se han obtenido valores de D_0 inferiores para los electrodos modificados con PtNPs y dendrímero que con los modificados solamente con dendrímero. Este hecho se ha atribuido a la menor homogeneidad que presentan los electrodos modificados por PtNPs en su superficie. Sin embargo, como se ha podido observar, estas superficies menos homogéneas no han afectado a la constante de la velocidad, que es mayor para los electrodos modificados con PtNPs.

Al estudiar las tres generaciones de dendrímero, se observó una mejor respuesta cinética en el electrodo modificado **AMD5/PtNPs** (quinta generación), por ello se estudiaron sus características analíticas a pH 7.0 mediante la medida amperométrica de sucesivas adiciones de paracetamol a diferentes potenciales.

Tabla 2.4. Estudio analítico de la detección de paracetamol.

E (V vs. SCE)	Rango lineal (μM)	Ecuaciones (μA vs. μM)	R ²	LD (μM)
0.40	0–3550	$y = (0.001 \pm 0.002)x + (0.005 \pm 0.001)$	0.9991	3.45
	3550–17550	$y = (7.0 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4})x + (1.22 \pm 0.02)$	0.9983	
0.45	0–700	$y = (0.004 \pm 0.001)x + (0.029 \pm 0.003)$	0.9992	0.27
	700–3500	$y = (0.003 \pm 0.002)x + (0.742 \pm 0.001)$	0.9985	
	3500–14000	$y = (8.0 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4})x + (1.775 \pm 0.002)$	0.9973	
0.50	0–100	$y = (0.013 \pm 0.001)x - (0.003 \pm 0.002)$	0.9994	0.24
	100–1000	$y = (0.010 \pm 0.002)x + (0.645 \pm 0.004)$	0.9962	
	1000–4000	$y = (0.006 \pm 0.002)x + (4.433 \pm 0.003)$	0.9929	
	4000–10000	$y = (0.004 \pm 0.002)x + (14.949 \pm 0.01)$	0.9942	
	10,000 – —	$y = (0.002 \pm 0.003)x + (26.6 \pm 0.007)$	0.9977	
0.60	0–200	$y = (0.016 \pm 0.003)x + (7 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-4})$	0.9949	0.20

En la tabla 2.4 se muestra la respuesta de nuestro sensor. Cabe destacar los amplios rangos de respuesta lineal de los electrodos, mucho mejores que los descritos en la bibliografía, con buenos coeficientes de correlación. Estos sensores presentan además bajos límites de detección y una sensibilidad bastante aceptable, teniendo en cuenta su sencillez. La respuesta de los electrodos se mantuvo estable con el paso del tiempo, manteniendo un mes después el 95% de su respuesta inicial.

Para completar la caracterización y puesta a punto de estos sensores, se realizaron estudios con los principales interferentes del paracetamol, como ácido ascórbico, glucosa, dopamina y urea. Se realizaron medidas amperométricas a potencial 0.5 V (vs. SCE) en presencia de concentraciones 500 veces superiores de dopamina, ácido úrico y glucosa, comprobando que no interfieren en la media de 8 μM de paracetamol. Sin embargo, en el caso del ácido ascórbico, concentración 500 veces superior a la de paracetamol origina un incremento de un 20% sobre la señal, constituyendo una importante interferencia.

Para evitar esta interferencia se utilizó voltametría diferencial de pulsos (DPV), con la intención de conseguir la resolución de ambos picos. Mediante esta técnica no solo se observa la resolución de los picos con separación suficiente, sino que también podemos observar que al aumentar la concentración de paracetamol, disminuye la intensidad del pico correspondiente a ácido ascórbico, hasta su desaparición total para una relación de concentraciones de paracetamol/ácido ascórbico de 0.3. Este fenómeno puede achacarse al hecho de que la oxidación del paracetamol tiene lugar sobre la superficie del electrodo, por lo que a partir de una determinada concentración, el paracetamol bloquea la entrada de ácido ascórbico debido a la rápida reacción que presenta.

Finalmente se estudió la aplicación de nuestro sensor para la detección de paracetamol en muestras reales de diferentes preparados farmacéuticos comerciales sin y con ácido ascórbico (Gelocatil, Dolocatil y Efferalgan Vitamina C). En la tabla 2.5 se puede observar que se ha obtenido una gran reproducibilidad, detectando con una gran precisión la concentración de paracetamol presente en fármacos comerciales.

Tabla 2.5. Estudio de detección de paracetamol en muestras reales.

Muestra	[PCT] A (mg)	[PCT] D (mg)	Recuperado	%RSD
Gelocatil PCT 1000 mg	127.83	126.56	99.01	1.9
		129.25	101.11	2.0
		127.92	100.07	1.5
		127.36	99.63	1.3
		128.00	100.13	1.9
Dolocatil PCT 1000 mg	132.75	133.57	100.62	2.0
		133.87	100.84	1.5
		155.27	102.67	1.6
Efferalgan Vit C PCT 330 mg AA 200 mg	151.23	152.00	100.51	1.5
		152.33	100.73	1.8

En esta parte de la investigación se ha demostrado que la incorporación de nanopartículas de Pt nos ha permitido desarrollar nuevos sensores de paracetamol más eficientes y sensibles debido a su superficie eficaz incrementada y al efecto sinérgico catalítico con los grupos ferroceno que interactúan, se han probado en la medida de muestras reales obteniendo excelentes resultados.

2.1.7. PUBLICACIONES GENERADAS Y TAREAS REALIZADAS

Todos los resultados obtenidos en este apartado se muestran en las siguientes publicaciones:

Artículo 1. Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles, publicado en: *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014, 190, 111. Autores: Almudena Jiménez, M. Pilar García Armada, José Losada, Carlos Villena, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado.

Tareas realizadas por Carlos Villena Morales:

- Estudios cinéticos de los electrodos sin y con nanopartículas de platino.
- Estudio de la cinética de los biosensores.

Artículo 2. New acetaminophen amperometric sensor based on ferrocenyl dendrimers deposited onto Pt nanoparticles, publicado en: *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2016, 20, 1551. Autores: M. Pilar García Armada, Eduardo Vallejo, Carlos Villena, José Losada, Carmen M. Casado, Beatriz Alonso.

Tareas realizadas por Carlos Villena Morales:

- Síntesis y caracterización de los dendrímeros.
- Preparación de superficies electródicas con dendrímeros sin y con nanopartículas de platino.
- Estudios cinéticos de todos los electrodos sin y con nanopartículas de platino.
- Estudio analítico de determinación de paracetamol.
- Estudios de interferencias y medidas en muestras reales.

2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO INTERDENDRÍTICAS E INTRADENDRÍTICAS UTILIZANDO DENDRÍMEROS ELECTROPOSITADOS SOBRE ELECTRODOS COMO PLANTILLA Y SUS APLICACIONES EN CATÁLISIS

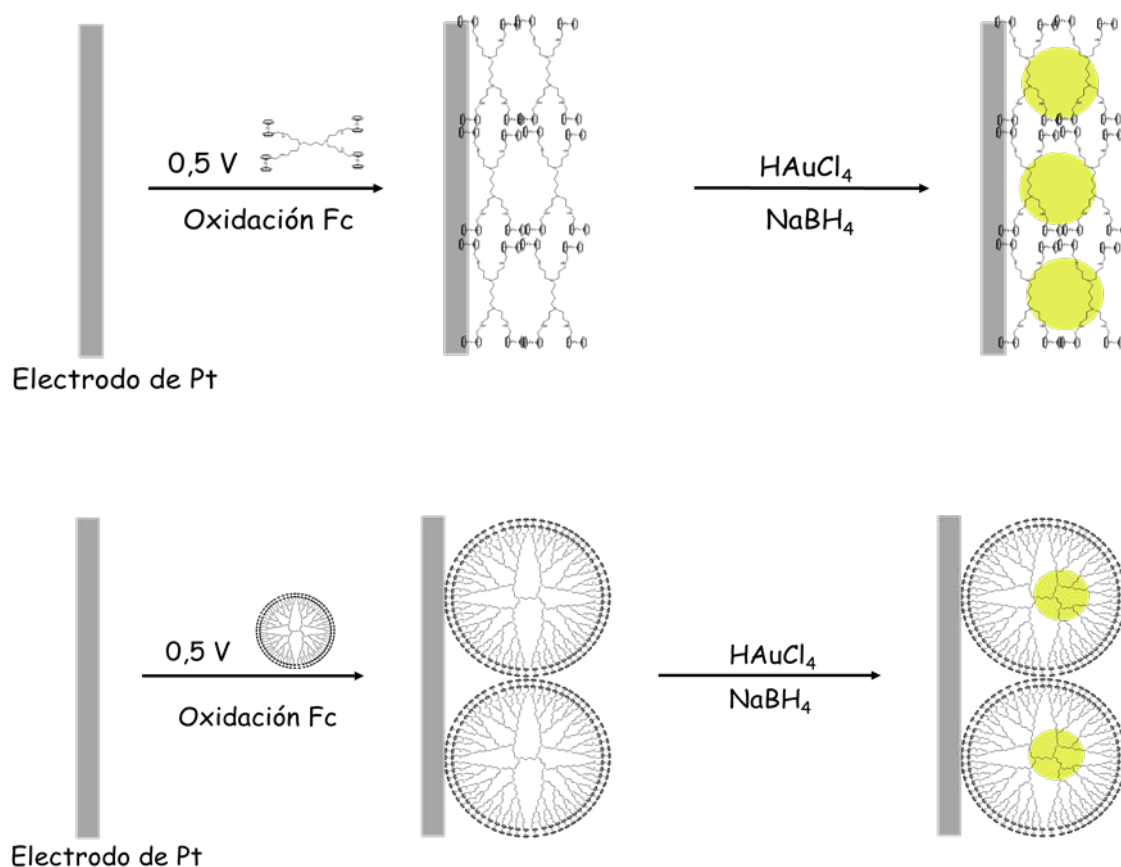
Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral, quizá el de mayor trascendencia, fue preparar superficies electródicas modificadas con nanopartículas de oro (AuNPs), de tamaños controlados, obtenidas sobre películas de dendrímeros electrodepositados, usados como plantilla, y estudiar sus aplicaciones catalíticas.

Basándonos en las distintas metodologías de formación de nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros (DENS) descritas en la bibliografía, y tomando como referencia los estudios de R. Crooks²⁷ por la similitud de sus esqueletos dendríticos y de D. Astruc²⁸ por sus dendrímeros funcionalizados con ferrocenos, decidimos aplicar métodos similares a los que utilizaron estos autores para obtener nanopartículas de oro en suspensión coloidal.

Para llevar a cabo esta fase de la investigación, decidimos emplear los dendrímeros con esqueleto dendrítico DAB y funcionalizados con amidoferroceno, **AMD1**, **AMD3** y **AMD5**, ya descritos anteriormente, y DAB-1-(NHCH₂Fc)₄, DAB-3-(NHCH₂Fc)₁₆, DAB-5-(NHCH₂Fc)₆₄, sintetizados de acuerdo a procedimiento ya descrito,²⁹ denominados respectivamente **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**.

Se decidió aplicar un procedimiento similar al utilizado en disolución tanto por D. Astruc como por R. Crooks, mediante un proceso de dos etapas, captación y coordinación de los iones metálicos a los puntos activos de la película de dendrímero y reducción química de los iones capturados para generar nanopartículas encapsuladas dentro de cada macromolécula o, más grandes, ubicadas en los huecos entre dendrímeros.

Como ya se ha citado, decidimos utilizar los electrodos modificados con los dendrímeros con grupos amida y amina de tres generaciones, para estudiar posibles diferencias en cuanto a la estructura de las películas y/o coordinación de los iones metálicos, esperando que las generaciones inferiores produjeran nanopartículas estabilizadas entre distintas moléculas de dendrímero (interdendríticas) mientras que los dendrímeros de mayor tamaño permitieran obtener mayoritariamente nanopartículas de mucho menor tamaño, estabilizadas en el interior de los dendrímeros (intradendríticas), tal y como se muestra en el esquema 2.3.



Esquema 2.3. Esquema de formación de los DENs.

Para sintetizar las AuNPs, en primer lugar se modificaron electrodos de disco de Pt con los distintos dendrímeros a potencial constante de 1.0 V (vs. Ag/Ag^+), como ya se explicó anteriormente.

En la primera etapa, se sumergieron los electrodos modificados en una disolución agitada de HAuCl_4 0.1 mM para provocar la interacción entre el Au^{III} y los N del esqueleto dendrítico durante 10 min. A continuación, y para asegurar la completa eliminación de la película de los iones no coordinados, se sumergieron los electrodos en agua desionizada agitando vigorosamente durante otros 10 minutos. En la segunda etapa, se introdujeron los electrodos durante 10 min en una disolución agitada de NaBH_4 0.1 mM/ NaOH 0.3 M, teniendo el NaOH la función de disminuir la velocidad de reacción.³⁰ Por último, se lavan los electrodos de nuevo del mismo modo que al finalizar la etapa 1.

En el caso de los dendrímeros **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**, para evitar la reducción masiva de los iones oro por el ferroceno, descrita anteriormente por Astruc,³¹ se protegieron dichos grupos mediante oxidación electroquímica previa, en un medio más coordinante que el anión AuCl_4^- , como el Cl^- (a 0.55 V (vs. SCE) en KCl 0.1 M).

En los dendrímeros **AMD1**, **AMD3** y **AMD5** no fue necesario realizar ningún pretratamiento debido a que el efecto electro-atrayente del grupo amida desplaza el potencial de oxidación del ferroceno hacia valores más positivos.

Una vez obtenidos los seis tipos de electrodos, se procedió a la caracterización electroquímica, espectrofotométrica y morfológica de los mismos. La gran dificultad de este trabajo reside en la medida del tamaño de las AuNPs. En medio homogéneo la medida de los tamaños de NPs se realiza mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), la técnica más utilizada para caracterizar nanopartículas de pequeño tamaño. Sin embargo, en nuestro caso no pudimos utilizar esta técnica debido a la imposibilidad de preparar los electrodos sobre las rejillas de cobre, que no resisten los potenciales de deposición de los dendrímeros.

Con el fin de estimar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas a partir de las diferentes plantillas dendríticas, fue necesario utilizar distintas técnicas como voltametría, microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica de barrido, y espectrofotometría.

El estudio electroquímico de electrodos modificados permitió observar las ondas características de la oxidación de la superficie del oro, que aparecen en torno a 1 V, y la correspondiente reducción de la monocapa de óxido adsorbido,³² en un rango de potencial entre 0.55 y 0.58 V. Estas ondas tan características confirman que las NPs se encuentran en la superficie del electrodo y son electroquímicamente activas. A través de la integración del pico de reducción se pudo calcular el área real de oro sobre el electrodo aplicando la conversión más aceptada de $390 \mu\text{C}/\text{cm}^2$.³³

La medida del espesor de las películas de dendrímero depositadas nos permite establecer una relación entre los grupos ferroceno y los átomos de nitrógeno, para de este modo calcular el n° de átomos de nitrógeno presentes en la película. A la vez, considerando que las AuNPs presentan una estructura esférica podemos calcular su área y compararla con la obtenida experimentalmente. Este estudio demuestra una muy buena correlación entre el número de átomos de nitrógeno de las películas y el número estimado de átomos de oro depositados.

Por otro lado, es sabido que la formación de nanopartículas de oro sigue un patrón de número de átomos de oro/nanopartícula de tal manera que las nanopartículas formadas constan de unos determinados números de átomos preferentes. Estos son los llamados números mágicos,³⁴ y teniéndolos en cuenta, es posible realizar una estimación de los posibles tamaños que pueden formarse. Comparando los datos electroquímicos con estas estimaciones se aprecia claramente una tendencia hacia la formación de nanopartículas más pequeñas al aumentar la generación de los dendrímeros, afirmando la hipótesis de la formación de nanopartículas intradendríticas encapsuladas en la cavidad del dendrímero, y nanopartículas interdendríticas estabilizadas en huecos entre distintos dendrímeros, del mismo modo que en medio homogéneo.

A continuación se realizó la caracterización espectrofotométrica, con el fin de observar la banda de plasmón característica que presentan las nanopartículas metálicas. Efectivamente, en los seis casos apareció una pequeña banda de plasmón superficial (520, 540 y 548 nm para **Au-AMN1**, **Au-AMN3** y **Au-**

AMN5; y 533, 527 y 569 nm para **Au-AMD1**, **Au-AMD3** y **Au-AMD5** respectivamente), localizada en el rango de longitud de onda descrito en la bibliografía para AuNPs de ese tamaño,³⁵ que confirma la presencia de AuNPs y nos aproxima que la estimación de tamaños es correcta, aunque no permite afinar el tamaño de las nanopartículas.

Para completar los estudios realizados a los electrodos, se utilizaron la microscopia de fuerza atómica (AFM) y las microscopias electrónicas de barrido (SEM) y de barrido de alta resolución (HRSEM).

Aunque AFM tampoco es la técnica ideal para el estudio de películas de dendrímero ya que, incluso con puntas ultrafinas y el modo tapping, durante el contacto con la película, se va acumulando cierta masa de dendrímero que va aumentando el radio de la punta, lo que provoca distorsión de las medidas. No obstante, esta técnica nos ha permitido estudiar la densidad y la rugosidad de las películas y observar cómo las películas se hacen más compactas después de modificarlas con AuNPs. La compactación de las películas aumenta al aumentar la generación de los dendrímeros y las películas de los dendrímeros **AMD1**, **AMD3** y **AMD5** son más densas y su incremento con la generación es más pronunciado que las de los dendrímeros **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**, probablemente debido a las mayores fuerzas intermoleculares que presenta el grupo amida. El aumento de densidad con la generación se explica porque, según se ha descrito anteriormente,³⁶ los dendrímeros de primera generación depositados son más rígidos, mientras que los de generación 4 y superiores presentan un comportamiento viscoelástico y las generaciones intermedias presentan comportamiento intermedio. Este comportamiento es el responsable de un aplanamiento de los dendrímeros y, en consecuencia, del aumento de la densidad.

Después de formar las AuNPs se observa en la 1^a generación un gran incremento en la compactación de la película, sin embargo este fenómeno es mucho menos pronunciado en los dendrímeros de 3^a y sobre todo de 5^a generación, debido a la formación de AuNPs intradendríticas, de menor tamaño, en el interior de las cavidades internas de los dendrímeros, haciendo que el

efecto observado de la compactación sea menor. Al disminuir el tamaño de las AuNPs, disminuye también la posibilidad de adsorción de átomos de nitrógeno de dendrímeros en la superficie de las nanopartículas, disminuyendo la posibilidad de sus efectos de aplanamiento y aumento de densidad. La diferencia de comportamiento entre las quintas generaciones de amino y amidoferrocenildendrímico se explican por la menor porosidad de las películas de amidodendrímico, que permiten una distribución más profunda de aniones en el interior de la película y que aumentan la compacidad de sus películas tras la formación de las AuNPs.

Para completar el estudio morfológico de los electrodos, se modificaron hilos de Pt siguiendo el mismo procedimiento y se sometieron a inspección mediante microscopio electrónico de barrido de alta resolución. Las micrografías, mostradas en la figura 2.6, mostraron que el tamaño de las nanopartículas es marcadamente decreciente al aumentar la generación de los dendrímeros (tabla 2.6). En el caso de los dendrímeros de 1^a generación se observa que se obtienen nanopartículas ligeramente mayores para **AMD1** que con **AMN1**, lo que lleva a pensar que el tamaño está controlado por la densidad de la película además de por la concentración de oro coordinado en la misma. Esto puede estar causado por un intercambio entre el contraión del grupo ferricinio (cloruro) por tetracloroaurato. Al aumentar la generación este efecto se hace menor debido a que los grupos ferroceno van estando menos accesibles.

Las películas de los dendrímeros de 3^a generación presentan nanopartículas de menor tamaño y menor dispersión que las de 1^a generación, debido a que los huecos entre las moléculas de dendrímico son menores, y probablemente más regulares.

Finalmente las AuNPs obtenidas con películas de dendrímeros de 5^a generación presentan muy poca dispersión y tienen un tamaño muy pequeño. No se pueden medir con exactitud debido a que la máxima resolución del cursor del microscopio es de 3.5 nm. Sin embargo, comparando con nanopartículas visualmente mayores, que el cursor mide como 3.5 nm, es posible asignar, también visualmente, a las más pequeñas un tamaño entre 1 y 2 nm.

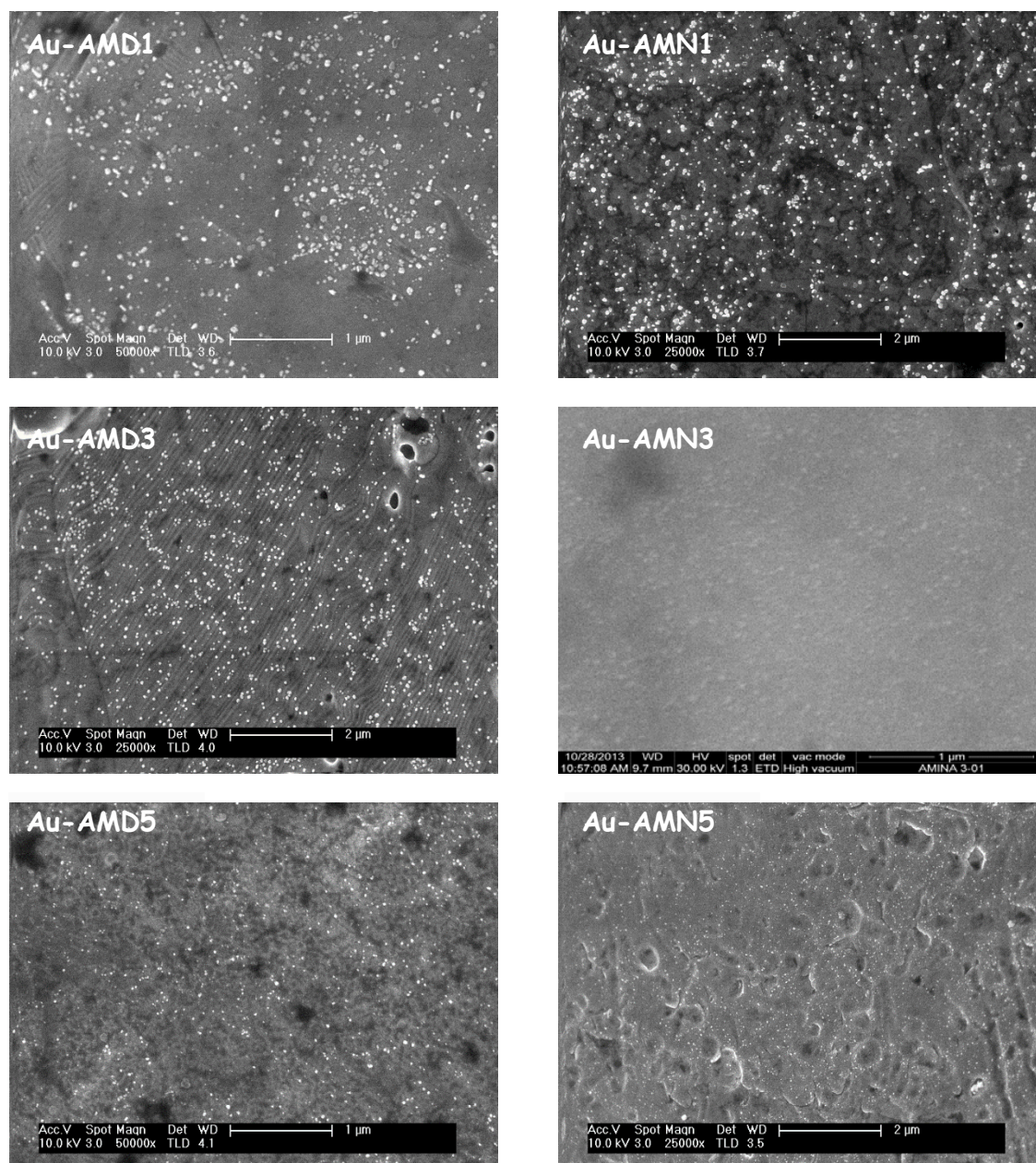


Figura 2.6. Imágenes de SEM hilos modificados con dendrímero y AuNPs.

Tabla 2.6. Tamaños de las AuNPs medidos por HRSEM. *Calculado de los datos obtenidos por AFM.

Electrodo	Densidad* (g cm ⁻³)	Tamaño max (nm)	Tamaño min (nm)	Tamaño más frecuente (nm)
Au-AMN1	0.003	100	5	80
Au-AMN3	0.025	36	9	23
Au-AMN5	0.042	25	1-2	1-2
Au-AMD1	0.002	66	5	60
Au-AMD3	0.046	50	7	37
Au-AMD5	0.123	25	1-2	1-2

Como conclusión, basándonos en todos los estudios realizados, podemos decir que los dendrímeros de 1^a y 3^a generación dan lugar mayoritariamente a AuNPs interdendríticas, donde el control del tamaño es más complejo; mientras que los dendrímeros de 5^a generación forman en su mayoría AuNPs intradendríticas de tamaños entre 1 y 2 nm.

El límite de este tipo de síntesis está en el tamaño de los huecos intradendríticos y el impedimento estérico de los grupos funcionales periféricos, ya que la penetración del reactivo estará estéricamente impedida en generaciones superiores a la sexta.³⁷

2.2.1. APLICACIONES CATALÍTICAS DE LAS SUPERFICIES ELECTRÓDICAS PREPARADAS

Una vez obtenidas las distintas superficies electrocatalíticas, resulta muy interesante estudiar diferentes aplicaciones en las que el tamaño de las AuNPs influye en la catálisis, como el caso de la reacción de reducción de oxígeno o la oxidación de dopamina. También nos pareció de gran interés el estudio de la catálisis de la oxidación y reacción del peróxido de hidrógeno para abrir una nueva línea de producción de biosensores con enzimas oxidasas.

Adicionalmente, los dendrímeros que albergan nanopartículas intramoleculares presentan una característica prometedora. El analito debe penetrar dentro de la estructura y la reacción debe producirse en el espacio intradendrítico en que se encuentra la AuNP, por lo que el tamaño del dendrímero controla la entrada del reactivo, actuando como un filtro nanoscópico selectivo de la actividad catalítica.

2.2.2. CATALIZADOR DE REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE OXÍGENO (ORR)

Los electrodos preparados se estudiaron como catalizadores de la reacción de reducción de oxígeno (ORR), siempre en el punto de mira para la preparación de pilas de combustible más eficientes. El oxígeno es considerado

el mejor combustible limpio debido a su abundancia y su alto potencial redox para formar agua.

Los mejores catalizadores de la ORR son generalmente nanopartículas de Pt o Au@Pt. Se ha demostrado que el tamaño de las nanopartículas tiene efecto sobre la cinética de la ORR, ya que la cinética de la ORR disminuye al disminuir el tamaño de las nanopartículas.³⁸ Sin embargo, recientemente se ha probado que las AuNPs con tamaño inferior a 2 nm, con una estrecha distribución de diámetros, depositadas en soportes conductores, presentan una alta actividad catalítica para la ORR y se consideran como una alternativa al catalizador de nanopartículas de platino.³⁹

Basados en los resultados de estos trabajos, pensamos que el estudio de la catálisis de la reducción de oxígeno no solo representa una aplicación de las superficies desarrolladas, sino que nos aportan información sobre la distribución y tamaño de las nanopartículas obtenidas. De acuerdo a la última referencia, los desarrollos con las plantillas de quinta generación deberían ser los más adecuados para catalizar la ORR.

El estudio de la actividad catalítica se realizó con los electrodos modificados con películas de los dendrímeros **AMN1** y **AMN5**, sin y con AuNPs. Se seleccionaron los dendrímeros con grupos amina debido a que presentaban mayor eficiencia catalítica. El dendrímero de 3^a generación (**AMN3**) mostró un comportamiento similar al de 1^a generación.

Los electrodos preparados con películas de los dendrímeros, debido a su funcionalización con ferroceno, presentaron buen comportamiento catalítico para la reacción de reducción de oxígeno, pero la modificación con AuNPs mejoró significativamente la eficiencia catalítica. Efectivamente, se demostró que los electrodos con AuNPs intradendríticas, las más pequeñas, son más eficientes que las interdendríticas obtenidas con las generaciones 1^a y 3^a, de acuerdo con la bibliografía.

Los voltamogramas obtenidos con electrodo rotatorio de disco mostraron que la reacción de reducción comienza a un potencial de 0.00 V (vs. SCE) incluso a bajas velocidades de rotación. Este valor es bastante más bajo que los descritos en la bibliografía para AuNPs.

Como ya se ha citado, la ORR es un tipo de reacción sensible a la superficie, en la que el tipo de material del electrodo afecta enormemente a la actividad catalítica. La mayoría de los estudios han demostrado que en electrodos de oro en medio ácido, ocurre la reducción de oxígeno bielectrónica a bajos sobrepotenciales. De hecho se han publicado catalizadores basados en AuNPs que permiten, bien la reducción bielectrónica de oxígeno, o bien la reducción tetraelectrónica como una sucesión de dos pasos bielectrónicos, con peróxido de hidrógeno como especie intermedia.⁴⁰ Muy recientemente ha sido publicado un catalizador de ORR de alto rendimiento basado en nanoclusters de oro soportados sobre nanohojas de carbono que muestra la reducción de oxígeno tetra-electrónica en un único paso.⁴¹ En nuestro caso, para los electrodos preparados con dendrímero **AMN5** como plantilla, se observó reacción bielectrónica en un margen de potenciales entre -0.11 y -0.15, y tetraelectrónica a partir de -0.20, demostrando la alta eficiencia del catalizador desarrollado.

Con respecto al estudio cinético, los electrodos preparados con dendrímero **AMN5** como plantilla mostraron una cinética más rápida que los preparados con los dendrímeros **AMN1** o **AMN3**. Esta diferencia se debe exclusivamente a las AuNPs, ya que en las películas formadas únicamente por dendrímeros no se observa diferencia.

Por último, los electrodos preparados fueron estables al menos durante un mes ya que no se observó pérdida de actividad ni formación de agregados de las nanopartículas.

2.2.3. SENSOR DE DOPAMINA

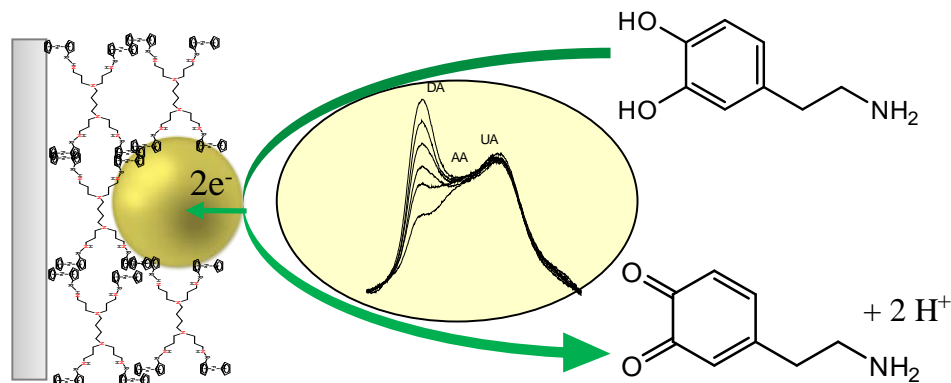
La dopamina (DA) es un neurotransmisor producido en el sistema nervioso central y en la medula suprarrenal y desempeña un papel muy importante en muchas funciones del cerebro.⁴² Interviene en el funcionamiento de los sistemas renal, hormonal y cardiovascular y su deficiencia puede llevar a enfermedades como parkinson, esquizofrenia o alzheimer. Unos niveles anómalos de DA pueden ser indicativo de enfermedades graves como cáncer, estrés extremo y ansiedad o lesiones en las glándulas suprarrenales.

La DA es un compuesto electroactivo, lo que le permite detectarlo mediante técnicas electroanalíticas, aunque uno de los principales problemas asociado a este tipo de detección es que su potencial de oxidación sobre electrodos convencionales es muy próximo al de sus principales interferentes, ácido ascórbico (AA) y ácido úrico (AU), teniendo en cuenta que la concentración normal de dopamina en orina es aproximadamente 100 veces menor que la concentración de ácido úrico.⁴³ Además, como en otros casos anteriores, nos encontramos ante posibles problemas derivados de la adsorción de los productos de su oxidación que pueden causar envenenamiento de los electrodos.

Las propiedades tamaño-dependientes de las AuNPs, han generado interés creciente para la fabricación de electrodos modificados para la determinación de DA, que aporten mayor sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. En este sentido, hay algunas contribuciones interesantes realizadas en los últimos años. Por ejemplo, se han publicado sensores de dopamina basados en AuNPs obtenidos con diferentes polímeros,⁴⁴ grafeno,⁴⁵ en monocapas autoensambladas,⁴⁶ etc.⁴⁷ Sin embargo, dada la diferencia de materiales base y tamaños no se ha asignado una relación concreta entre la eficiencia de estos sensores y el tamaño de las AuNPs.

La oxidación de dopamina sigue un camino de pérdida de dos electrones y dos protones para dar lugar a dopamina-o-quinona (Figura 2.4). Al igual que en los trabajos anteriores, se hizo necesario estudiar el posible efecto catalítico

del ferroceno para observar la catálisis debida a las AuNPs. Por esta razón se realizaron estudios cinéticos, analíticos y de interferencias tanto de los electrodos con AuNPs como de los modificados sólo con dendrímeros.



Esquema 2.4. Proceso redox de la molécula de dopamina.

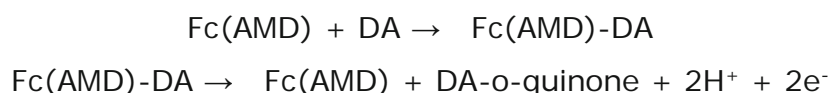
En esta nueva aplicación, la familia de amidoferrocenildendrimeros mostró mejor comportamiento frente a la oxidación de dopamina, y tampoco se observó gran diferencia entre las plantillas formadas por dendrímeros de primera y tercera generación, por lo que el estudio se circunscribió a las plantillas con dendrímeros de 1^a y 5^a generación (**AMD1** y **AMD5**) que modificados con oro formaron nanopartículas interdendríticas e intradendríticas respectivamente.

Del mismo modo que sucedió con la reacción de reducción del oxígeno, los electrodos modificados con dendrímero resultaron buenos catalizadores de la reacción de oxidación de la dopamina, y la modificación con AuNPs mejoró notablemente sus propiedades.

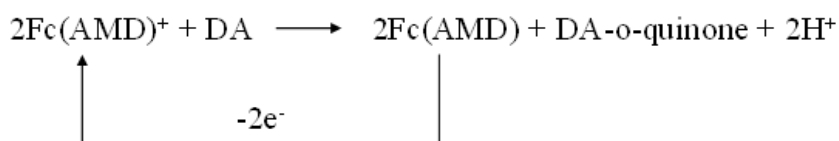
En el estudio cinético de los electrodos modificados con AuNPs, se observó un comportamiento similar al mostrado por los modificados con dendrímeros, estudiados y descritos en el sensor de paracetamol. Muestran diferencias de potenciales de pico prácticamente constantes a cualquier velocidad entre 0.1 y 5 $V \cdot s^{-1}$, indicando que tampoco tienen limitaciones cinéticas. También los electrodos modificados con AuNPs mostraron un cambio de comportamiento lineal de i_p frente a la velocidad de barrido, que resultó proporcional a $v^{1/2}$,

permitiendo el cálculo de los coeficientes de transferencia de carga, que resultaron ser de dos órdenes de magnitud superior al obtenido con los electrodos modificados solamente con los dendrímeros.

La onda de oxidación de dopamina, en el caso de los electrodos modificados con dendrímeros, no coincide con la oxidación del mediador, lo que indica la existencia de interacción entre la dopamina y los grupos amida y amina presentes en el dendrímero que dan lugar a la formación de un complejo intermedio de acuerdo al siguiente esquema:



Sin embargo, este comportamiento varía en función del grosor de las películas de dendrímero. Al aumentar el grosor de las películas aparecen limitaciones derivadas de la ineficiente propagación de carga a través de la película que dificulta la transferencia electrónica y va desapareciendo la onda catalítica observada en películas más finas. Sin embargo aparece una nueva onda de oxidación al mismo potencial del sistema redox ferroceno/ferricinio y se produce un aumento sustancial del pico anódico del ferroceno y una disminución del pico catódico, como corresponde a un proceso catalítico. Este cambio de comportamiento indica un cambio en el mecanismo de la oxidación de la dopamina, que pasa a suceder a través de un nuevo esquema:



Los valores de la constante de velocidad obtenidos, para recubrimientos no muy gruesos de película, mediante estudios con electrodo rotatorio, fueron dependientes de la concentración, confirmando la formación de un complejo de transferencia de carga entre el ferroceno y la dopamina.

En los electrodos modificados con AuNPs, se observa cómo la presencia de AuNPs disminuye el potencial de oxidación y provoca un aumento en la intensidad del pico, mejorando la eficiencia catalítica de los electrodos modificados solamente con dendrímeros. Se estudiaron electrodos de distintos recubrimientos (1.0×10^{-10} - 5.0×10^{-9} mol Fc/cm²) y, a diferencia de los electrodos sin AuNPs, la oxidación resultó independiente del recubrimiento de la película. Así mismo, las constantes de velocidad obtenidas mediante estudios con electrodo rotatorio fueron independientes de la concentración, indicando un cambio del lugar en el que ocurre la oxidación de la dopamina, que ahora ocurre principalmente en la superficie de las AuNPs.

El estudio analítico de los diferentes sensores se realizó a pH 7.0 utilizando las técnicas de cronoamperometría y voltametría diferencial de pulsos. En la tabla 2.7 se recogen los resultados, que son acordes con los obtenidos en el estudio cinético, mostrando una mejor respuesta los electrodos con nanopartículas interdendríticas, de mayor tamaño, es decir, el electrodo modificado con AuNPs obtenidas con el dendrímero **AMD1** como plantilla.

Tabla 2.7. Estudio analítico de dopamina.

Electrodo	Γ (mol Fc/cm ²)	E (V vs. SCE)	Sensibilidad (μ A/mM cm ²)	Rango lineal (μ M)	R ²	LD (μ M)
AMD1	$1.1 \cdot 10^{-9}$	0.30	308.6	0–550	0.9928	2.4
AMD5	$9.6 \cdot 10^{-10}$	0.30	304.3	0–550	0.9905	2.7
			585.7	0–70	1	0.01
Au-AMD1	$7.5 \cdot 10^{-10}$	0.30	466.0	70–600	0.9981	
			314.3	600–1000	0.9968	
		0.25	345.3	0–400	0.9946	0.02
		0.20	218.2	0–200	0.9960	0.04
Au-AMD5	$3.9 \cdot 10^{-10}$	0.30	330.0	0–200	0.9965	0.1
		0.25	142.8	0–300	0.9971	0.2
		0.20	72.5	0–200	0.9983	0.8

El estudio analítico de los diferentes sensores se realizó a pH 7.0 utilizando las técnicas de cronoamperometría y voltametría diferencial de pulsos. En la tabla 2.7 se recogen los resultados, que son acordes con los obtenidos en el estudio cinético, mostrando una mejor respuesta los electrodos

con nanopartículas interdendríticas, de mayor tamaño, es decir, el electrodo modificado con AuNPs obtenidas con el dendrímero **AMD1** como plantilla.

Por último se realizó el estudio de interferencias y la aplicación a muestras reales. Los principales interferentes para la detección de la dopamina son el ácido ascórbico y el ácido úrico, por lo que se estudió mediante DPV la respuesta del electrodo óptimo frente a estos analitos, observando los picos de potencial de oxidación de AA y AU a 0.24 y 0.45 V (vs. SCE) respectivamente. Cabe destacar la poca sensibilidad frente a ambos analitos, 55.86 y 12.19 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^{-2}$ respectivamente, en contraposición a la señal de 651.17 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^{-2}$ obtenida por la dopamina. Por ello, en presencia de 0.2 mM de AA se consiguió llevar a cabo la detección de dopamina en un rango de concentración de 10-60 μM con un límite de detección de 0.13 μM , ligeramente superior al observado en ausencia de AA. A continuación se estudió la detección de dopamina en presencia de 0.2 mM de AA y 0.2 mM de AU, mostrando resultados similares a los obtenidos en ausencia y presencia de AA, pero con un ligero aumento del límite de detección hasta 0.20 μM . Hay que hacer notar que el sensor desarrollado sirve también como sensor de AA y AU, aunque con menores sensibilidades.

Estos resultados nos mostraron las posibilidades de aplicar el sensor para realizar medidas en dos tipos de muestras reales: orina humana y un preparado comercial de dopamina inyectable. En ambos casos, se determinó la concentración de dopamina con suficiente exactitud y precisión.

En base a los resultados obtenidos en la determinación de dopamina, se considera que son dispositivos ideales por su menor complejidad en relación con otros descritos en la bibliografía. Además, estos electrodos mantuvieron una respuesta estable y presentaron una excelente reproducibilidad y estabilidad.

2.2.4. SENSOR DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La última aplicación desarrollada fue para la catálisis de las reacciones de oxidación y reducción del peróxido de hidrógeno. El estudio de la actividad

catalítica del sensor se realizó con los electrodos modificados con películas de los dendrímeros **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**, sin y con AuNPs. Este trabajo se encuentra en preparación y no ha sido enviado todavía para su publicación porque decidimos incluir un estudio de simulación molecular de los dendrímeros que probara que los huecos disponibles en su interior y exterior resultan coherentes con los tamaños de las nanopartículas obtenidas. Dicho estudio, realizado por el profesor del Departamento de Ingeniería Química Industrial y del Medio Ambiente de la E. T. S. I. Industriales Salvador León Cavanilles, acaba de concluir, se encuentra en fase de redacción y esperamos que pronto pueda ser incorporado al manuscrito para su publicación.

Aunque este trabajo no constituye una publicación a unir al compendio, considero importante incluir aquí un breve resumen de los resultados obtenidos.

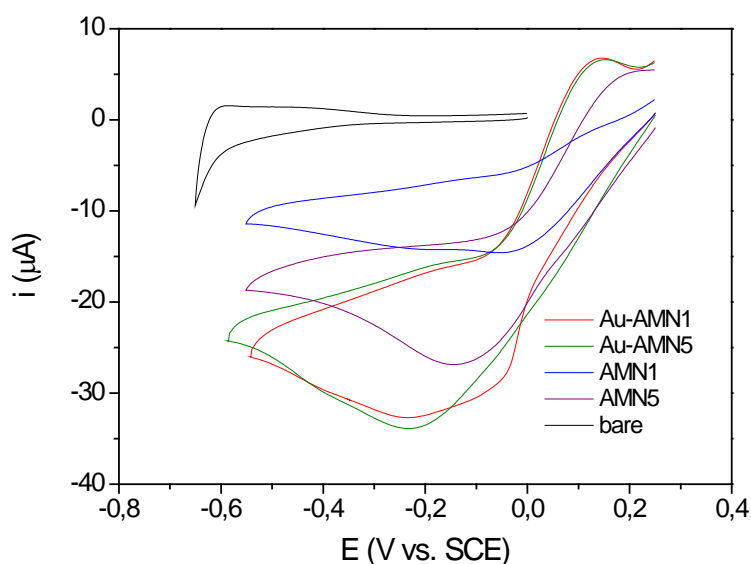


Figura 2.7. CVs obtenidos con electrodos modificados con Au-AMN1 ($\Gamma = 1.7 \cdot 10^{-9} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), Au-AMN5 ($\Gamma = 6.35 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), AMN1 ($\Gamma = 1.04 \cdot 10^{-9} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), AMN5 ($\Gamma = 5.32 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) y con un electrodo limpio de platino, en presencia de H_2O_2 2 mM en PBS pH 7.0 a velocidad de barrido de 20 mV s^{-1} .

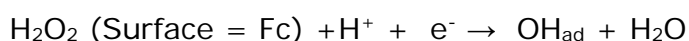
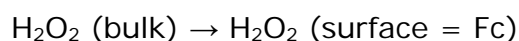
La figura 2.7 muestra los ciclovoltamogramas obtenidos con los cuatro electrodos modificados para la reducción de peróxido de hidrógeno. Ya sobre los electrodos modificados solamente con dendrímero, la reducción de H_2O_2 comienza a potenciales bajos, incluso positivos, con intensidad muy alta en

comparación con un electrodo no modificado y la intensidad de pico i_p crece linealmente con el incremento de la concentración.

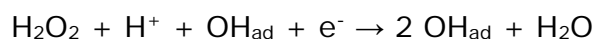
Como puede observarse, la corriente mejora mucho para los electrodos que contienen AuNPs. La eficiencia calculada sobre la respuesta del Pt limpio es del 490%, 914%, 1010%, 1070% para los electrodos modificados con **AMN1**, **AMN5**, **Au-AMN1** y **Au-AMN5** respectivamente. Este comportamiento es característico de una reacción electrocatalítica y vemos como la eficiencia es mucho mayor para los electrodos que contienen oro.

El mecanismo de la reducción de peróxido de hidrógeno mostró en todos los casos una dependencia con la concentración, y los CVs obtenidos para concentraciones ≥ 2 mM presentan evidentes diferencias con los obtenidos a concentraciones menores. Cuando se alcanza una concentración de H_2O_2 2 mM se aprecia la aparición de un segundo pico de reducción a -0.20 V (vs. SCE), así como el desarrollo de un pico de oxidación con valores de E_p próximos a 0.15 V (vs. SCE).

Los valores de la constante de velocidad obtenida para la reducción de peróxido de hidrógeno sobre los electrodos modificados con dendrímero fueron dependientes de la concentración de peróxido, indicando la posibilidad de formación de un complejo de transferencia de carga, al igual que en los casos anteriores (dopamina y NADH). Algunos autores⁴⁸ consideran que la reducción de H_2O_2 ocurre a través de la formación de especies adsorbidas OH_{ad} , por lo que el esquema seguido sería:

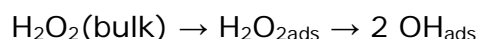


En presencia de OH_{ad} la reducción directa se activa y procede a alta velocidad:

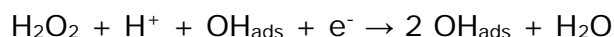


A altas concentraciones de peróxido también tiene lugar el paso electroquímico de OH_{ad} a H_2O debido a la alto recubrimiento superficial de OH_{ad} y este paso puede ser el causante de la segunda onda catódica a -0.2 V (vs. SCE). Puede concluirse que la reducción de H_2O_2 procede mediante un mecanismo autocatalítico.

Los electrodos con nanopartículas de oro mostraron un comportamiento diferente ya que sus constantes cinéticas fueron independientes de la concentración de peróxido. Esto indica un cambio de mecanismo, explicado también previamente, en el que el H_2O_2 se disocia en os especies OH en la superficie metálica del electrodo:



Seguido por:



Por tanto, se puede afirmar que, en presencia de AuNPs, la reducción puede tener lugar en la superficie de éstas y la formación de cualquier complejo con el ferroceno es mucho menos significativa.

Con respecto a la oxidación de H_2O_2 , la figura 2.8 muestra claramente que los electrodos modificados también poseen actividad catalítica. La onda de oxidación es desplazada catódicamente y las corrientes de pico son sustancialmente superiores a las obtenidas con in electrodo de platino limpio. En el caso de los electrodos que contienen AuNPs puede apreciarse que los picos salen más adelantados y muestran mayor intensidad que los modificados con los dendrímeros correspondientes. Este comportamiento indica que los electrodos con AuNPs poseen actividad catalítica más eficiente. La corriente en los potenciales de pico aumentó el 250%, 350%, 525%, 780% para **AMN1**, **AMN5**, **Au-AMN1** y **Au-AMN5** respectivamente.

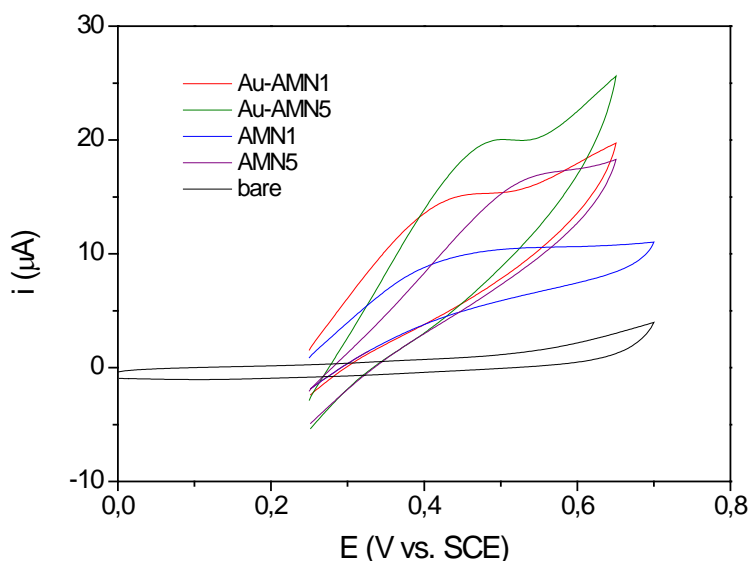
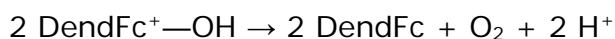
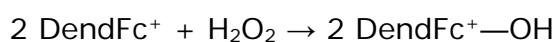
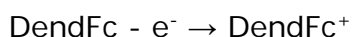


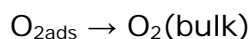
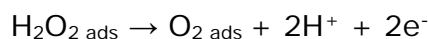
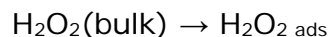
Figura 2.8. CVs obtenidos con electrodos modificados con Au-AMN1 ($\Gamma = 1.7 \cdot 10^{-9} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), Au-AMN5 ($\Gamma = 6.35 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), AMN1 ($\Gamma = 1.04 \cdot 10^{-9} \text{ mol Fc cm}^{-2}$), AMN5 ($\Gamma = 5.32 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) y con un electrodo limpio de platino, en presencia de H_2O_2 2 mM en PBS pH 7.0 a velocidad de barrido de $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

El potencial al que se produce la oxidación es, en todos los casos, coincidente con la oxidación de los grupos ferrocenilo, indicando que éstos tienen una evidente actividad catalítica y están claramente involucrados en la oxidación del peróxido. Además, y al igual que en el caso de la reducción, las constantes de velocidad para los electrodos modificados con dendrímero fueron dependientes de la concentración de peróxido, pudiendo suponer, por lo tanto, para la oxidación electrocatalítica de H_2O_2 en estos electrodos, un mecanismo en dos pasos en el que el sustrato debe estar unido a los centros ferroceno para ser oxidado:



En el caso de los electrodos que contienen oro, las constantes de velocidad, también al igual que para la reducción, son independientes de la concentración de peróxido y el mecanismo de la oxidación debe ser diferente al

anterior. Ahora, el proceso de oxidación debe ocurrir probablemente a través de un paso intermedio en el cual se forma $\text{HOO}^-_{\text{ads}}$ y que sigue el esquema general:⁴⁹



El gradiente de los diagramas lineales Koutecky–Levich permite calcular, además de los coeficientes de difusión, los valores de las constantes de Levich ($\text{Lev} = 0.62^{2/3} v^{-1/6}$) y comparar sus resultados con los de un electrodo limpio ($\text{Lev} = 8.9 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1/2}$ para $D^0_{\text{peróxido}} = 1.71 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $v = 0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). En el caso de la oxidación, los valores de Lev resultaron menores que el correspondiente al electrodo limpio, indicando que la reacción ocurre en cualquier lugar del interior de la película y que su velocidad global puede ser controlada por la velocidad de difusión de los electrones y/o del sustrato. En el caso de la reducción, las constantes Levich fueron similares o ligeramente superiores a la del electrodo limpio y, además los coeficientes de difusión encontrados para el peróxido de hidrógeno son similares o algo superiores al de una disolución acuosa, confirmando que la velocidad de la reacción global no está controlada por difusión y que la reacción catalítica ocurre en la interfase película-disolución. Un resumen de los resultados obtenidos en el estudio cinético se muestra en la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Resultados de los estudios electroquímico y cinético				
Electrodo	Γ (mol cm ⁻²)	k (cm s ⁻¹)	D^0 (cm ² s ⁻¹)	Lev (cms ^{-1/2})
Oxidación				
AMN1	$4.34 \cdot 10^{-10}$	$7.80 \cdot 10^{-3}$	$1.54 \cdot 10^{-5}$	$8.27 \cdot 10^{-4}$
AMN5	$5.32 \cdot 10^{-10}$	$6.44 \cdot 10^{-3}$	$1.24 \cdot 10^{-5}$	$7.18 \cdot 10^{-4}$
Au-AMN1	$4.62 \cdot 10^{-10}$	$8.30 \cdot 10^{-3}$	$1.41 \cdot 10^{-5}$	$7.80 \cdot 10^{-4}$
Au-AMN5	$6.35 \cdot 10^{-10}$	$6.71 \cdot 10^{-3}$	$1.55 \cdot 10^{-5}$	$8.32 \cdot 10^{-4}$
Reducción				
AMN1	$4.87 \cdot 10^{-10}$	$1.45 \cdot 10^{-3}$	$1.97 \cdot 10^{-5}$	$9.79 \cdot 10^{-4}$
AMN5	$4.62 \cdot 10^{-10}$	$2.52 \cdot 10^{-3}$	$1.53 \cdot 10^{-5}$	$8.22 \cdot 10^{-4}$
Au-AMN1	$5.45 \cdot 10^{-10}$	$2.17 \cdot 10^{-3}$	$1.78 \cdot 10^{-5}$	$9.10 \cdot 10^{-4}$
Au-AMN5	$4.52 \cdot 10^{-10}$	$5.14 \cdot 10^{-3}$	$1.69 \cdot 10^{-5}$	$8.81 \cdot 10^{-4}$

A continuación, se pusieron a punto los métodos de determinación amperométrica de peróxido de hidrógeno en reducción y oxidación con los electrodos modificados con ambos dendrímeros, estableciendo los potenciales óptimos de trabajo, rangos lineales, sensibilidad y límites de detección. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.9.

Tabla 2.9. Resultados analíticos de la determinación de peróxido de hidrógeno.

Electrodo	Γ (molFc/cm ²)	E (V vs. Ag/AgCl)	Sensibilidad (μ A/mM)	Rango lineal (mM)	LD (μ M)
AMN1	$4.90 \cdot 10^{-10}$	-0.20	1.87	10^{-3} - 4.0	6.10
			30.7	4.0 - 15.0	
AMN5	$4.60 \cdot 10^{-10}$	-0.20	14.0	$5 \cdot 10^{-3}$ - 1.50	0.040
			2.42	10^{-3} - 2.0	0.046
Au-AMN1	$5.50 \cdot 10^{-10}$	-0.20	36.0	2.0 - 12.0	
			12.3	$5 \cdot 10^{-3}$ - 1.50	0.064
			5.16	$5 \cdot 10^{-3}$ - 2.0	0.17
Au-AMN5	$4.34 \cdot 10^{-10}$	-0.20	39.0	2.0 - 10.0	
			10.23	$5 \cdot 10^{-3}$ - 2.0	0.05
			17.42	$5 \cdot 10^{-3}$ - 2.0	
		0.40	12.1	$5 \cdot 10^{-3}$ - 2.0	0.87
			38.2	2.0 - 10.0	
			7.95	10^{-3} - 2.0	0.058
		0.50	16.95	10^{-3} - 2.0	

En este trabajo se demostró que las nuevas superficies catalíticas obtenidas son eficientes catalizadores tanto de la reducción como de la oxidación del peróxido de hidrógeno, quedando abierta una nueva línea de investigación para la inmovilización de enzimas oxidasas o/y peroxidasas para la construcción de biosensores.

2.2.5. PUBLICACIONES GENERADAS Y TAREAS REALIZADAS

Los detalles de esta investigación y las principales conclusiones obtenidas quedan reflejados en los siguientes artículos publicados:

Artículo 3. Easy preparation of electrode surfaces with dispersed size-controlled Au nanoparticles by electrodeposited PPI-dendrimers as templates. publicado en: Journal of the Electrochemical Society, 2017, 164 (6), H396. Autores: Carlos Villena, José Losada, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado, M. Pilar García Armada.

Tareas realizadas por Carlos Villena Morales:

- Síntesis y caracterización de los dendrímeros.
- Preparación de superficies electródicas con dendrímeros sin y con nanopartículas de oro.
- Estudios cinéticos, morfológicos y espectrofotométricos de todos los electrodos sin y con nanopartículas de oro.

Artículo 4. Size-controlled gold nanoparticles obtained from electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimer-templates for the electrochemical sensing of dopamine. publicado en: Applied Surface Science, 2017, 420, 651. Autores: Carlos Villena, Marta Bravo, Beatriz Alonso, Carmen M. Casado, José Losada, M. Pilar García Armada.

Tareas realizadas por Carlos Villena Morales:

- Preparación de superficies electródicas con dendrímeros sin y con nanopartículas de oro.
- Estudios cinéticos de todos los electrodos sin y con nanopartículas de oro.
- Estudio analítico de determinación de dopamina con electrodos con nanopartículas de oro.
- Estudio de interferencias y medidas en muestras reales de dopamina en orina humana.

Tareas realizadas por Carlos Villena Morales en el trabajo Size-controlled gold nanoparticles from electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) templates as hydrogen peroxide electrocatalyst. En preparación.

- Preparación de superficies electródicas con dendrímeros sin y con nanopartículas de oro.
- Estudios cinéticos de todos los electrodos sin y con nanopartículas de oro.
- Estudio analítico de determinación de peróxido de hidrógeno con electrodos con nanopartículas de oro.

2.3. REFERENCIAS

1. (a) Caminade, A.-M.; Turrin, C. O.; Laurent, R.; Ouali, A.; Delavaux-Nicot, B. *Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2011. (b) Mao, H.; Li, Y.; Liu, X.; Zhang, W.; Wang, C.; Al-Deyab, S. S.; El-Newehy, M. *J. Colloid. Interface. Sci.* **2011**, *356*, 757. (c) Song, H. -K.; Lee, S. H.; Won, K.; Park, J. H.; Kim, J. K.; Lee, H.; Moon, S. -J.; Kim, D. K.; Park, C. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1749.
2. Huang, T.; Jiang, R.; Zhang, D.; Zhuang, J.; Cai, W.; Yu, A. *J. Solid State Electrochem.* **2010**, *14*, 101.
3. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, New York, USA, 2010.
4. (a) García Armada, M.P.; Jiménez, A.; Losada, J.; Alonso, B.; Casado, C.M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 1778. (b) de la Cruz, G.; Schüle, H.; Losada, J.; García-Armada, M.P.; Frey, H.; Alonso, B.; Casado, C.M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**
5. Laviron, E. *J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem.* **1979**, *101*, 19.
6. Cuadrado, I.; Morán, M.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Lobete, F.; García, B.; Ibisate, M.; Losada, J. *Organometallics* **1996**, *15*, 5278.
7. Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.* **1981**, *122*, 36.
8. Murray, R. W. en Bard, A. J. *Electroanalytical chemistry vol. 13*, Marcel Dekker, New York, 1984.
9. García Armada, M. P.; Losada, J.; López-Villanueva, F. J.; Frey, H.; Alonso, B.; Casado, C. M. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 2803.
10. Munteanu, F. D.; Kubota, L. T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *509*, 2.
11. Azevedo, A. M.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Fonsxeca, L. P. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 235.
12. Esti, M.; Volpe, G.; Compagnone, D.; Mariotti, G.; Moscone, D.P.G. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 39.
13. Zhou, M.; Shang, L.; Li, B.; Huang, L.; Dong, S. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 442.
14. Bosch, M. E.; Sanchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 291.
15. (a) Prabakar, S. J. R.; Narayanan, S. S. *Talanta* **2007**, *72*, 1818. (b) Martin, F. L.; McLean, A. E. *Drug Chem. Toxicol.* **1998**, *21*, 477.

-
16. Ni, Y.N.; Liu, C.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *419*, 185.
 17. Kumar, K.G.; Letha, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 1725.
 18. Moreira, A.B; Oliveira, H.P.M.; Atvars, T.D.Z.; Dias, I.L.T.; Neto, G.O.; Zagatto, E.A.G.; Kubota, L.T. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *539*, 257.
 19. Johnson, K.A.; Plumb, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *810*, 39805.
 20. (a) Liu, X.; Zhang, X. Y.; Wang, L. L.; Wang, Y. Y. *Microchim Acta.* **2014**, *181*, 1439. (b) Sánchez-Obrero, G.; Mayén, M.; Rodríguez Mellado, J. M.; Rodríguez Amaro, R. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6*, 2001.
 21. (a) Madrakian, T.; Haghshenas, E.; Afkhami, A. *Sens. Actuators B.* **2014**, *193*, 451. (b) Umasankar, Y.; Unnikrishnan, B.; Chen, S.; Ting, T. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 484.
 22. Li, J.; Liu, J.; Tan, G.; Jiang, J.; Peng, S., Deng, M.; Qian, D., Feng, I.; Liu, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 468.
 23. Kissinger, P.T.; Roston, D. A.; Van Benschoten, J. J.; Lewis, J. Y.; Heineman, W. R. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 772.
 24. Wang, S. -F., Xie, F.; Hu, R. -F. *Sens. Actuators B.* **2007**, *123*, 495.
 25. Kalimuthu,P.; John, S. A. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 303.
 26. Ribeiro, A.; Barros, M.; Veríssimo, L.; Santos, C.; Cabral, A., Gaspar, G. D.; Estesó, M. A. *J. Chem. Thermodynamics.* **2012**, *54*, 97.
 27. (a) Zhao, M.; Sun, L.; Crooks, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4877. (b) Garcia, M. E.; Baker, L.A.; Crooks, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 256.
 28. Astruc, D.; Ornelas, C.; Ruiz, J., *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 841.
 29. Salmon, A.; Jutzi, P. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *595*, 637.
 30. Kim, Y. G.; Oh, S. K.; Crooks, R. M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 167.
 31. Lian, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2010**, *20*, 503.
 32. Trasatti S.; Petrii, O. A. *Pure and Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711.
 33. Yancey, D. F.; Zhang, L.; Crooks R. M.; Henkelman, G. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1033.
 34. Brack, M. *Sci. Am.* **1997**, *277*, 50.
 35. (a) Wang, Y.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3489. (b) Alvarez, M. M.; Khoury, J. T.; Schaaff, T. G.; Shafigullin, M. N.; Vezmar, I.; Whetten, R. L. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 3706.

36. Takada, K.; Díaz, D. J.; Abruña, H. D.; Cuadrado, I.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Morán, M.; Losada, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10763.
37. (a) Yeung, L. K.; Lee, C. T., Jr.; Johnston, K. P.; Crooks, R. M. *Chem. Comm.* **2001**, *21*, 2290. (b) Zhao, M.; Tokuhisa, H.; Crooks, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2596.
38. Myers, V.S.; Weir, M.G.; Carino, E.V.; Yancey, D.F.; Pande S.; Crooks, R.M. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1632.
39. Fujigaya, T.; Kim, C. R.; Hamasaki Y.; Nakashima, N. *Sci. Rep.* **2016**, 21314.
40. Rameshkumar, P.; Praveen R.; Ramaraj, R. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *754*, 118.
41. Wang, Q.; Wang, L.; Tang, Z.; Wang, F.; Yan, W.; Yang, H.; Zhou, W.; Li, L.; Kanga, X.; Chen, S. *Nanoscale*, **2016**, *8*, 6629.
42. (a) Moreno, M.; Arribas, A. S.; Bermejo, E.; Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Rodríguez, M. C.; Jalit, Y.; Rivas, G. A. *Talanta* **2010**, *80*, 2149. (b) Li, Y.; Liu, X.; Liu, X.; Mai, N.; Li, Y.; Wei, W.; Cai, Q. *Colloids Surf. B* **2011**, *88*, 402.
43. Chernecky, C. C.; Berger, B. J. *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*, Third ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001.
44. (a) Yusoff, N.; Pandikumar, A.; Ramaraj, R.; Lim, H.N.; Huang, N.M. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 2091. (b) Devasenathipathy, R.; Mani, V.; Chen, S.M.; Viswanath, B.; Vasantha, V. S.; Govindasamy, M. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 55900. (c) Lee, C. Y.; Hsu, D.Y.; Prasannan, A.; Kalaivani, R.; Hong, P.D. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *363*, 451. (d) Fabregat, G.; Armelin, E.; Alemán, C. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4669. (e) Chu, W.; Zhou, Q.; Li, S.; Zhao, W.; Li, N.; Zheng, J. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *353*, 425. (f) Khudaish, E.A.; Al-Nofli, F.; Rather, J.A.; Al-Hinaai, M.; Laxman, K.; Kyawc, H.H.; Al-Harthy, S. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *761*, 80. (g) Sajid, M.; Nazal, M. K.; Mansha, M.; Alsharaa, A.; Jillani, S. M. S.; Basheer, C. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *76*, 15.
45. (a) Lian, Q.; Luo, A.; An, Z.; Li, Z.; Guo, Y.; Zhang, D.; Xue, Z.; Zhou, X.; Lu, X. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *349*, 184. (b) Thanh, T.D.; Balamurugan, J.; Lee, S.H.; Kim, N. H.; Lee, J.H. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 259.
46. (a) Hu, G.Z.; Zhang, D.P.; Wu, W.L.; Yang, Z.S. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *62*, 199. (b) Xue, C.; Han, Q.; Wang, Y.; Wu, J.; Wen, T.; Wang, R.; Hong, J.; Zhoun, X.; Jiang, H. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *49*, 199.
47. (a) Yang, C.Y.; Chen, S.M.; Palanisamy, S. *J. Electrochem. Sci.* **2016**, *11*, 2638. (b) Yang, L.; Huang, N.; Lu, Q.; Liu, M.; Li, H.; Zhang, Y.; Yao, S. *Anal. Chim. Acta.* **2016**, *903*, 69.
48. (a) Katsounaros, I.; Schneider, W.B.; Meier, J.C.; Benedikt, U.; Biedermann, P. U.; Auer, A.A.; Mayrhofer, K.J.J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7384. (b) Patra, S.;

Munichandraiah, N. *J. Chem. Sci.* **2009**, *121*, 675. (c) Flätgen, G.; Wasle, S.; Lübke, M.; Eickes, C.; Radhakrishnan, G.; Doblhofer, K.; Ertl, G. *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 4499. (d) Honda, M.; Kōdera, T.; Kita, H. *Electrochim. Acta* **1986**, *31*, 377.

49. (a) Miah, M.R.; Ohsaka, *J. of the Electrochem. Soc.* **2006**, *153*, E195. (b) Nørskov, J. K.; Rossmeisl, J.; Logadottir, A.; Lindqvist, L.; Kitchin, J. R.; Bligaard, T.; Jónsson, H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 17886.

CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales aportaciones realizadas y las conclusiones más importantes de esta Tesis Doctoral:

1. En cumplimiento del primer objetivo de esta Tesis, se han preparado diversas superficies electródicas modificadas con estructuras dendríticas (dendrímeros y polímeros) previamente sintetizadas y se ha realizado el estudio de sus propiedades electrocatalíticas y bioelectrocatalíticas. Para ello se han utilizado dos polímeros hiperramificados de carbosilano funcionalizados con ferrocenos interaccionantes (**PDAMS** y **PMDUS**) y se han preparado, siguiendo procedimientos ya existentes, tres generaciones de dos familias de dendrímeros con esqueleto DAB funcionalizados con grupos amidoferroceno, con grupos amida y amina (**AMD1**, **AMD3**, **AMD5**, **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**). Todos los polímeros y dendrímeros utilizados forman películas compactas que han sido caracterizadas morfológicamente.
2. Los electrodos modificados con los dendrímeros, **AMD1**, **AMD3**, **AMD5**, **AMN1**, **AMN3** y **AMN5** mostraron una cinética sin limitaciones, con valores de ΔE_p muy cercanos al de un sistema reversible en disolución homogénea ($0.058/n$) y fue posible calcular los coeficientes de transporte de carga por difusión, D_{ct} , que tomaron valores de orden de $10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para **AMD1**, **AMD3**, **AMD5** y de $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para **AMN1**, **AMN3** y **AMN5**.
3. En cumplimiento del segundo objetivo de esta tesis, se prepararon electrodos modificados con nanopartículas de platino, se depositaron sobre ellas los polímeros ramificados **PDAMS** y **PMDUS** y dendrímeros **AMD1**, **AMD3** y **AMD5** y se realizaron estudios morfológicos y cinéticos de las superficies preparadas concluyendo que la presencia de nanopartículas de platino, en todos los casos, aumentó la capacidad de promover transferencias electrónicas con el electrodo, obteniendo para los polímeros **PDAMS** y **PMDUS** unas constantes de velocidad de transferencia de 0.30 y 0.10 s^{-1} respectivamente. Los coeficientes de transporte de carga por difusión obtenidos para los electrodos preparados con PtNPs y los

- dendrímeros **AMD1**, **AMD3** y **AMD5** fueron entre 2.4 y 11.6 veces superiores a los correspondientes en ausencia de éstas.
- De acuerdo al tercer objetivo de esta tesis, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro inter e intra-dendríticas utilizando electrodos previamente modificados con películas de los dendrímeros **AMD1**, **AMD3**, **AMD5**, **AMN1**, **AMN3** y **AMN5** como plantillas.
 - Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (UHSEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), medidas espectrofotométricas de la banda de plasmón y medidas electroquímicas. Todos estos ensayos nos permitieron llegar a la conclusión de que las nanopartículas obtenidas presentan tamaños decrecientes al aumentar la generación de los dendrímeros compatibles con nanopartículas interdendríticas para las generaciones 1^a y 3^a e intradendríticas para las plantillas de 5^a generación.
 - Las propiedades electroquímicas y cinéticas de todas las películas preparadas con nanopartículas de oro de cualquier tamaño fueron mejores que las de las plantillas de dendrímero, obteniéndose coeficientes de transporte de carga por difusión del orden de $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para las **Au-AMD** y de $5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para las **Au-AMN**.
 - De acuerdo al cuarto objetivo de esta tesis, se han desarrollado y puesto a punto nuevos biosensores electroquímicos de NADH y de alcoholes, con enzima alcohol deshidrogenasa inmovilizada, basados en películas de **PDAMS/PtNPs** y **PMDUS/PtNPs**; nuevos sensores de paracetamol basados en **Au-AMD**; nuevos catalizadores de la reacción de reducción de oxígeno basados en **Au-AMN**; nuevos sensores de dopamina basados en **Au-AMD** y nuevos sensores de peróxido de hidrógeno basados en **Au-AMN**.
 - Los electrodos **PDAMS/PtNPs** y **PMDUS/PtNPs** fueron utilizados exitosamente como sensores para la oxidación electrocatalítica de NADH a potenciales menores o iguales a 0.5 V vs. SCE. Ambos polímeros fueron

capaces de proteger al electrodo del envenenamiento producido por NADH. Los rangos lineales y sensibilidades obtenidas resultaron mucho mejores que las de los electrodos sin PtNPs, y fueron comparables, y en muchos casos mejores, que los resultados de otros sensores encontrados en la bibliografía hasta ese momento. El electrodo **PDAMS/PtNPs**, con polímero de ramas más cortas, mostró ligeramente mayor constante de velocidad de oxidación de NADH, mayor sensibilidad y menor constante de Michaelis-Menten aparente, indicando mejor actividad bioelectrocatalítica. El electrodo **PMDUS/PtNPs**, con ramas más largas y flexibles, pero más denso, mostró un más amplio rango lineal de medida.

9. Los biosensores **ADH/PDAMS/PtNPs** y **ADH/PMDUS/PtNPs** resultaron más eficientes en la oxidación del NADH producido por la reacción enzimática en el interior de la película que del NADH en disolución, permitiendo una disminución en el potencial de trabajo hasta 0.25 V vs. SCE. Estos biosensores fueron usados con éxito para la determinación de metanol a pH neutro, con rangos lineales hasta 30 mM, sensibilidades de 0.957 y 0.756 mA M⁻¹ cm⁻² respectivamente, y constantes globales de velocidad 3.4 veces superiores a la de etanol. Estos biosensores miden también etanol aunque con inferior sensibilidad.
10. El biosensor **ADH/PDAMS/PtNPs** aporta mejor sensibilidad mientras que **ADH/PMDUS/PtNPs** es más rápido en la medida (2 s vs. 60 s) y posee límite de detección y rango lineal más amplio. El biosensor **ADH/PMDUS/PtNPs** fué validado para el análisis de methanol y etanol en bebidas.
11. Los sensores **AMD/PtNPs** mostraron un excelente comportamiento electrocatalítico frente a la oxidación de paracetamol, que exhibió un pico anódico a potencial 0.48 V vs. SCE. Se obtuvieron coeficientes de difusión para el paracetamol superiores a los de disolución acuosa, indicando que la reacción global no está controlada por difusión y que la reacción electrocatalítica tiene lugar en la superficie de los electrodos modificados.

12. El electrodo **AMD5/PtNPs** fué el mejor sensor de paracetamol, con un rango lineal más amplio que ningún otro sensor de paracetamol publicado hasta la fecha, y con un límite de detección muy bajo ($0.24 \mu\text{M}$). Este sensor no presenta interferencias de glucosa, dopamina ni urea y, utilizando DPV, su pico aparece bien resuelto del que ocasiona el ácido ascórbico. El pico del ácido ascórbico se ve influenciado por la presencia de paracetamol, por lo que su determinación simultánea no es posible. Este sensor se utilizó con éxito para la determinación de paracetamol en preparaciones farmacéuticas.
13. Los electrodos **Au-AMN** y **Au-AMD** fueron ensayados como catalizadores de la reacción de reducción de oxígeno. El electrodo **Au-AMN5** fue el más eficaz, con una corriente algo superior a su homólogo **Au-AMD5** y una onda de reducción que comienza a un potencial tan bajo como 0.00 V vs. SCE . Este hecho evidencia la mayor eficacia de las AuNPs de menor tamaño y mayor monodispersión. Las generaciones 1 y 3 mostraron dos etapas bielectrónicas sucesivas para la ORR, mientras que **Au-AMN5** mostró un mecanismo tetraelectrónico. Las constantes de velocidad son más altas que las obtenidas para electrodos modificados sin AuNPs, alcanzando la máxima diferencia para potenciales entre -0.25 y -0.4 V .
14. Los electrodos **Au-AMN** y **Au-AMD** fueron también ensayados como sensores de dopamina, mostrando mayor eficiencia la familia **Au-AMD**, con un excelente comportamiento electrocatalítico. Sobre estos electrodos la dopamina muestra un comportamiento reversible con picos a 0.19 y 0.24 V vs. SCE para **AMD1** y **AMD5** respectivamente, a diferencia de los electrodos modificados únicamente con los dendrímeros, en los que la oxidación de dopamina es irreversible y ocurre a potenciales 0.28 y 0.24 V . Los estudios cinéticos realizados mostraron que los electrodos modificados con **Au-AMD1**, que posee las nanopartículas de mayor tamaño, son los más eficientes, con una constante de velocidad heterogénea de segundo orden superior a las del resto de electrodos.

15. El sensor de dopamina **Au-AMD1** mostró muy buenas características analíticas, con tres tramos lineales a potencial de medida 0.3 V vs. SCE, que permiten medir concentraciones entre 0 y 1000 μM , con sensibilidad en el primer tramo (0 – 70 μM) de $585.7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ y límite de detección de 10 nM.
16. Después de realizado el estudio de interferencias mediante DPV, el sensor **Au-AMD1** permite medir dopamina en presencia de ácido ascórbico y ácido úrico, únicos interferentes con potencial similar a la dopamina presentes en muestras fisiológicas. El sensor fue utilizado con éxito para medir dopamina en una formulación farmacéutica y en muestras de orina humana.
17. Los electrodos **Au-AMN** y **Au-AMD** fueron también ensayados como catalizadores de la reducción y la oxidación de peróxido de hidrógeno, mostrando en este caso mayor eficiencia la familia **Au-AMN**. Los estudios realizados prueban que en los electrodos que contienen oro, las reacciones de oxidación y de reducción del peróxido cambian su mecanismo y el punto en el que tienen lugar, alcanzando eficiencias, en comparación con un electrodo limpio de 1010%, 1070% en reducción y de 525%, 780% en oxidación, para los electrodos **AuAMN1** y **Au-AMN5** respectivamente.
18. Los resultados obtenidos en el estudio analítico son similares para las tres generaciones **Au-AMN1**, **Au-AMN3** y **Au-AMN5**, lo que indica que estas reacciones no son dependientes del tamaño de las nanopartículas. En cualquier caso resultaron más sensibles y con menor límite de detección que los electrodos preparados sin AuNPs.
19. Por último, esta tesis doctoral ha abierto, al menos tres nuevas líneas de investigación:
 - a. Desarrollo de biosensores basados en electrodos **PDAMS/PtNPs** y **PMDUS/PtNPs** con nuevas enzimas deshidrogenasas.
 - b. Desarrollo de biosensores basados en electrodos **Au-AMN** con enzimas oxidasas y peroxidasas.

- c. Desarrollo de biosensores de tercera generación basados en **Au-AMN** y **Au-AMD** para la electroquímica de enzimas.

TRABAJOS PUBLICADOS

ARTÍCULO 1

Amperometric biosensors for NADH
based on hyperbranched dendritic
ferrocene polymers and Pt
nanoparticles



Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles



Almudena Jiménez^a, M. Pilar García Armada^{a,*}, José Losada^a, Carlos Villena^a, Beatriz Alonso^b, Carmen M. Casado^b

^a Dpto. de Ingeniería Química Industrial, ETSII, UPM, José Gutiérrez Abascal n° 2, 28006 Madrid, Spain

^b Dpto. de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, UAM, Francisco Tomás y Valiente n° 7, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2013

Received in revised form 21 August 2013

Accepted 22 August 2013

Available online xxx

Keywords:

Electrochemical biosensor

Pt nanoparticles

Bioelectrocatalysis

NADH

Alcohol dehydrogenase

Interacting ferrocenes

ABSTRACT

The electrocatalytic performance of electrodes modified with Pt nanoparticles (PtNPs) and two dendritic hyperbranched carbosilane polymers, polydiallylmethylsilane (PDAMS) and polymethyldiundecenylsilane (PMDUS) with interacting ferrocenes, has been investigated for the NADH oxidation. The catalytic synergy of PtNPs with the interacting ferrocenes is discussed in relation with the polymer structure. This effect have allowed us to develop efficient biosensors capable of measuring NADH from +0.3 V (vs. SCE) providing a total protection vs. the poisoning of the electrodes. The polymer/PtNPs/Pt electrodes tolerate wide linear concentration ranges for NADH to 2.5 mM ($R=0.9979$) and 2.1 mM ($R=0.99849$), with detection limits of 4.78 μM and 6.18 μM and sensitivities of 68.24 and 40.21 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for the PDAMS/PtNPs/Pt and PMDUS/PtNPs/Pt respectively. In the light of the good results obtained, novel amperometric alcohol biosensors were also successfully prepared with alcohol dehydrogenase (ADH). These devices showed more affinity for methanol than for ethanol, with a wide linear range to 30 mM and sensitivities of 0.957 and 0.756 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for the ADH/PDAMS/PtNPs/Pt and ADH/PMDUS/PtNPs/Pt respectively. The oxidation potential of the NADH enzymatically produced was negatively shifted to +0.25 V.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Efficient bioelectrocatalysis of electrochemical oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is of particular interest in the construction of dehydrogenase-based amperometric biosensors, because several hundred enzymatic reactions require NAD^+ as cofactor [1]. Consequently, a great variety of substrates with medical, chemical or biological importance as ethanol or lactic acid can be determinate using NAD -dependent biocatalysts. Moreover NADH plays a key role in cellular energy production, stimulates dopamine production and improves the cognitive functioning in patients with Parkinson's disease, depression, Alzheimer's disease and others (US2012029168-A1 patent). The electrochemistry of the couple NAD^+/NADH has been studied extensively [1–3] and it is widely accepted that the reaction occurs *via* a sequential two electrons and one proton electrochemical–chemical–electrochemical mechanism. However, the direct electro-oxidation of NADH on different conventional solid electrodes has some problems. A high overvoltage is often required and the surface fouling associated with the adsorption of reaction products [2,4,5] causes an anodic

shift of the NADH oxidation peak. In consequence, in the last years numerous efforts have been devoted to developing new electrode materials in order to reduce the overvoltage for NADH oxidation and minimize the surface fouling effect. Several attempts to reduce these disadvantages and accelerate the electron shuttle were based on the immobilization onto the electrode surface of mediating structures such as water soluble dye compounds [6,7], quinones [8,9], ferrocene derivatives [10,11], and several redox polymers [12]. The more recent approaches include the development of electrodes modified with several nanoscale materials employed successfully for this purpose [13–19]. Specifically, some authors have studied the enhancement of the NADH oxidation current by Pt nanoparticles (PtNPs) [20,21] and the role of Pt for the fast protonation of electrochemically formed NAD-radical [22].

Since some time ago we have been pursuing to design and synthesize mediators that can be easily electrodeposited onto the electrode surface and achieve a double target: be a good NADH/NAD^+ electrocatalyst and protect the electrode surface from the potential poisoning. In this way, ferrocene and its derivatives are excellent electron transfer mediators, widely used to construct mediated amperometric biosensors [23], and polymers or dendrimers functionalized with ferrocenyl units electronically communicated are interesting for this purpose. These redox polymers can be easily electrodeposited from non-aqueous solutions

* Corresponding author. Tel.: +34 913 363 185; fax: +34 913 363 009.
E-mail address: pilar.garcia.armada@upm.es (M.P.G. Armada).

and behave as bi-electronic groups for the NADH oxidation [24,25]. The ferrocene hyperbranched polymers, polydiallylmethylsilane (PDAMS) and polymethyldiundecenyilsilane (PMDUS) can be easily electrodeposited onto the platinum electrode surface. They have shown to be efficient redox mediators for the electrocatalytic tetra-electronic reduction of oxygen and for the reduction and oxidation of hydrogen peroxide [26]. Furthermore they are able to act as support and bioelectrocatalysts of oxydases to develop versatile and specific amperometric biosensors [27].

As it is known platinum nanoparticles (PtNPs) increase the surface area and provide an electron transfer with strong catalytic properties [28,29]. Our previous experiences [30] led us to think that the incorporation of PtNPs under the polymer films would allow developing new NADH biosensors more efficient and sensitive, because of their increased effective surface and the catalytic synergic effect with the interacting ferrocenes.

One of the main dehydrogenase-based biosensors applications is the alcohol determination using alcohol dehydrogenase (ADH) [18,31]. ADH is used in the determination of ethanol in controlling the fermentation process and product quality in several food and beverage industries [17,32,33], in clinical determination of serum and urine [34], in methanol biofuel cells [35], etc.

In this article, we describe the construction of novel amperometric NADH sensors with two carbosilane polymers with different length of branches electrodeposited on Pt electrodes with and without PtNPs. The kinetics, electrochemical properties and the ability of the developed composites to act as electrocatalysts in the NADH oxidation are discussed in relation with the length of the polymer branches and the presence of PtNPs. In addition, biosensing applications have been developed and novel amperometric alcohol biosensors were constructed using ADH immobilized on the surface of the carbosilane polymer-electrodes previously modified with PtNPs.

2. Material and methods

2.1. Reagents and solutions

The polymers were synthesized as reported recently [26] (Fig. S1 – Supporting information). β -Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) reduced disodium salt, β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), alcohol dehydrogenase (ADH) (>340 U/mg, from *Saccharomyces cerevisiae*), bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde (25% w/w solution in water), alcohols and solvents were purchased from Sigma. All other chemicals were analytical grade and were used without further purification. The 2 mM $\text{K}_2\text{PtCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.9\%$ from Aldrich) solution was prepared in 0.5 M H_2SO_4 . Ultrapure water was used for preparation of buffers and standards, and for electrochemistry solutions. The electrolyte bath for the polymer deposition contained 10^{-4} M in the redox active species (ferrocene) and 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate in dichloromethane. All other amperometric measurements were performed in 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 with 0.1 M NaClO_4 as supporting electrolyte. The solutions were deoxygenated by bubbling high-purity nitrogen for at least 15 min.

2.2. Apparatus

All electrochemical measurements were performed using an Ecochemie BV Autolab PGSTAT 12. The experiments were carried out in a conventional three-electrode cell at 20–21 °C with a Pt disc of 3 mm diameter as working electrode and a Pt wire as auxiliary electrode. A BAS non-aqueous Ag/AgCl reference electrode or a saturated Calomel reference electrode (SCE) were employed in

organic solvents and aqueous media respectively. In steady-state measurements, an Autolab rotating-disc electrode was used.

2.3. Preparation of polymer, polymer/PtNPs and ADH/polymer/PtNPs modified Pt electrodes

Briefly, the polymer films were electrodeposited onto Pt or PtNPs/Pt electrodes (see the Supplementary data for the PtNPs electrodeposition) according to a previously published procedure [26,27] under potentiostatic control at +0.7 V vs. Ag/AgCl. In all cases the surface (or effective surface) coverage of electroactive ferrocenyl sites in the films (Γ) was determined from the integrated charge of the cyclic voltammetric waves. The polymer modified electrodes were stored in ultrapure water at room temperature when not in use. The enzyme was immobilized onto the polymer/PtNPs/Pt electrodes by covalent cross-linking [36]. The biosensors were stored in ultrapure water at 4 °C when not in use (for the detailed preparation processes see the Supporting information).

2.4. Preparation of real samples

The non-alcoholic beer (NAB) was previously degasified by ultrasonic stirring during 20 min and spiked with 1 M ethanol (NABM) or 1 M methanol (NABE). The red wine samples were spiked with 0.5 M methanol (WM). Then, the samples were 5-fold diluted with phosphate buffer (pH 7.0)/ NaClO_4 (0.1 M). Aliquots of 200 μL (beer) or 300 μL (wine) of the corresponding diluted sample were added to 10 mL of the same buffer solution in the electrochemical cell.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of polymer/PtNPs/Pt electrodes

The differences in morphology and redox properties between PDAMS and PMDUS electrochemically deposited onto platinum electrodes have been described previously [26,27]. Films of PDAMS are rougher whereas those PMDUS form a more compact deposit and appear to be a smoother, more homogeneous and denser material, and consequently both polymers will offer different properties as bioelectrocatalyst and as support of enzymes on PtNPs. Films of both polymers cover the electrochemically deposited metallic nanoparticles completely, forming a composite with highly increased surface and polymer/PtNPs in close contact. Fig. 1 shows the SEM micrographs of the electrodeposited PtNPs (Fig. 1A) and the PMDUS polymer covering the PtNPs (Fig. 1B).

The cyclic voltammograms of PDAMS/PtNPs/Pt (Fig. 2) and PMDUS/PtNPs/Pt (not shown) electrodes in phosphate buffer (0.01 M)/ NaClO_4 (0.1 M) solution, show the peaks corresponding to interacting ferrocenyl units asymmetric and practically overlapped, as previously observed and discussed [24,26,27,37]. Plots of the anodic and cathodic peak currents vs. the scan rate (inset in Fig. 2) show a linear relationship for sweep rates below 0.2 V s^{-1} , indicating the surface confined nature of the electroactive groups as theoretically predicted for a surface-immobilized couple. The graphs of the peak potential vs. the logarithm of the scan rate (Fig. 3A and B) show that the peak separations increase as the sweep rate becomes faster, yielding straight lines, indicating a charge transfer kinetics limitation. The charge-transfer coefficients (α) and the electron transfer kinetic constants (k_s) of polymer/PtNPs/Pt electrodes have been determined from the plots E_p vs. $\log v$, in accordance with Laviron [38]. The obtained values for α were 0.72 and 0.60 for the PDAMS/PtNPs/Pt and PMDUS/PtNPs/Pt electrodes respectively. These values are larger than polymer/Pt electrodes

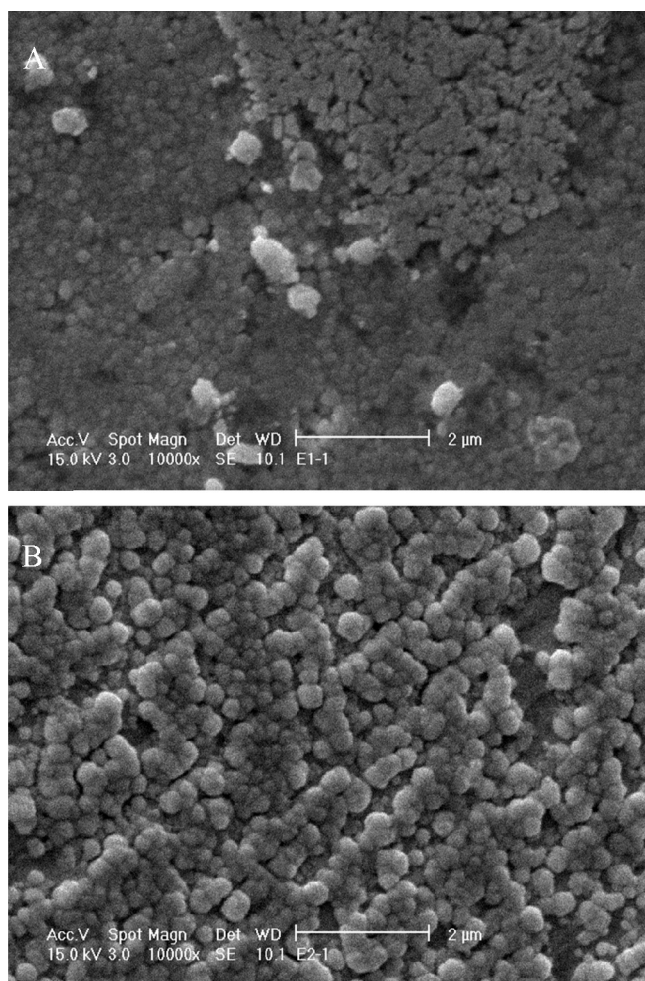


Fig. 1. SEM micrographs of platinum wire electrodes modified with electrodeposited PtNPs (A) and PMDUS/PtNPs (B).

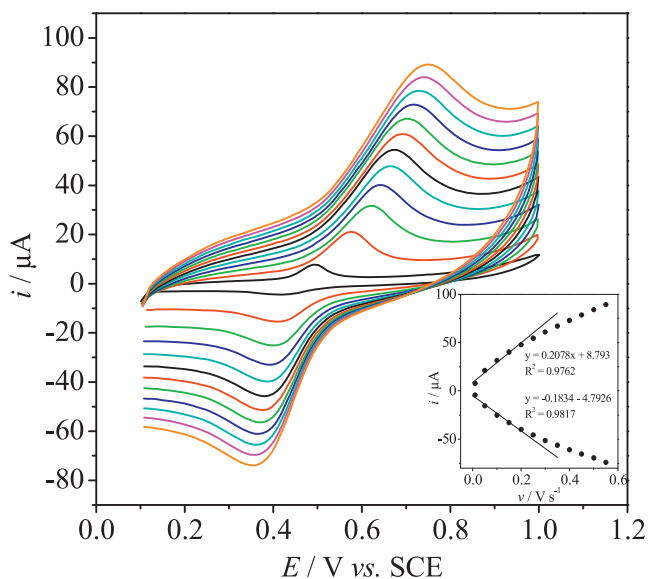


Fig. 2. Dependence of the peak current on the scan rate of a PDAMS/PtNPs/Pt electrode ($\Gamma = 3.8 \times 10^{-9}$ mol Fc cm⁻² thickness film) in phosphate buffer (pH 7.0)/NaClO₄ (0.1 M); scan rates: 10, 50, 100, 150 and 200 mV s⁻¹. Inset: linear dependence of the anodic peak current on the scan rate.

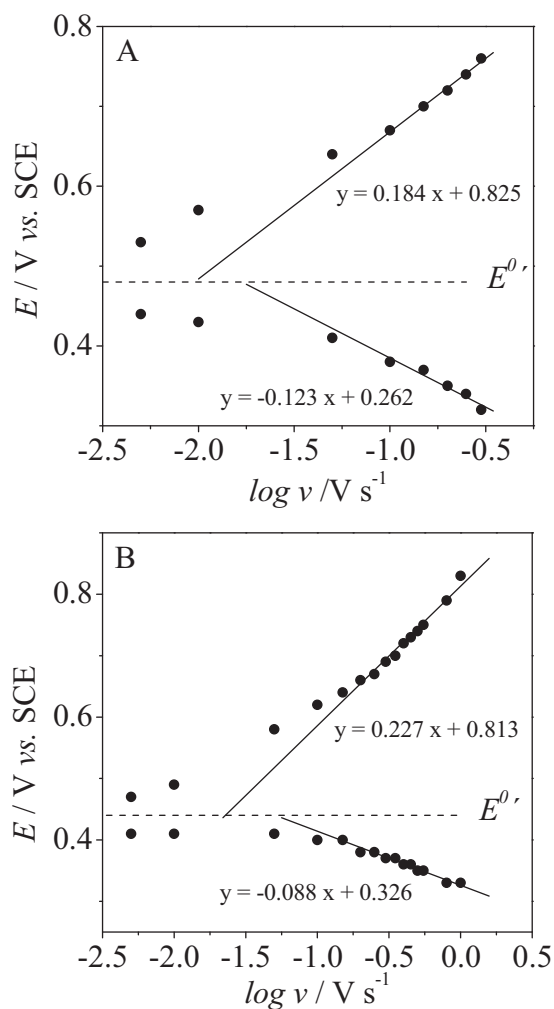


Fig. 3. Experimental variation of anodic and cathodic E_p as a function of $\log v$ for PDAMS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 3.8 \times 10^{-9}$ mol Fc cm⁻² thickness film) (A) and PMDUS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 1.5 \times 10^{-9}$ mol Fc cm⁻² thickness film) (B) electrodes respectively. Scan rate: 50 mV s⁻¹.

indicating that the polymer/PtNPs/Pt systems are capable of supplying large currents, even the mass-transfer-limited current, with smaller activation overpotential [39]. The obtained k_s were 0.30 and 0.10 s⁻¹ for PDAMS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 3.8 \times 10^{-9}$ mol Fc cm⁻²) and PMDUS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 1.5 \times 10^{-9}$ mol Fc cm⁻²) respectively. These constants indicate a high ability of the modified electrodes for promoting electron transfers between the redox polymer and the electrode surface in all cases.

3.2. Electrooxidation of NADH at polymer/Pt and polymer/PtNPs/Pt electrodes

The response of polymer/Pt electrodes studied by cyclic voltammetry showed that both polymers are very sensitive to the presence of NADH and the typical catalytic waves undergo a substantial enhancement in comparison with the signal of a Pt bare electrode (Fig. S2 – Supporting information). This fact is indicative of an improved electron transfer by electron hopping from site to site (redox catalysis) explained by the reaction scheme:



In addition, the waves appear at potentials from approximately +0.3 V (vs. SCE) therefore, the presence of ferrocene polymers allows a larger decrease of the overpotential, suggesting that the

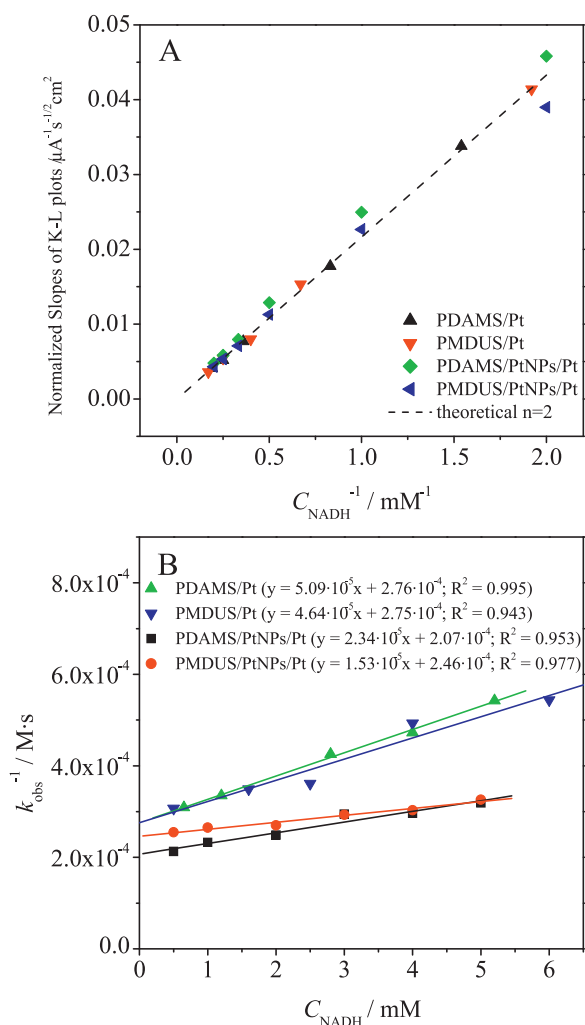


Fig. 4. Slopes of the Koutecky–Levich plots normalized with the effective area of each electrode (A) obtained for the new modified electrodes in phosphate buffer (pH 7.0)/NaClO₄ 0.1 M. The thickness of polymer films was between 2×10^{-10} and 5×10^{-10} mol Fc cm⁻². (B) Variation of k_{obs}^{-1} with the NADH concentration for the four different electrodes.

catalytic reaction is also of the chemical type and that strong mutual interactions between the catalyst and the substrate must occur during the course of the reaction, in agreement with Andrieux and Savéant [40].

The effect of the polymer film thickness on the response signal of the NADH oxidation was studied, and polymer films with coverage of about 2×10^{-10} mol Fc cm⁻² exhibited the best response in all cases. These results are coincident with those obtained with other substrates as hydrogen peroxide or glucose [26,27].

The kinetics of the catalyzed oxidation of NADH was investigated at polymer/Pt and polymer/PtNPs/Pt rotating-disc electrodes at +0.5 V (vs. SCE) in order to avoid the electrolysis rate limitation. In all cases, the Levich plots [41] showed linearity at low rotation rates, indicating mass-transport-limited kinetics, and also all plots deviated from linearity at higher rotation rates, which suggests a kinetic limitation. These data clearly indicate that the limiting currents observed at polymer as well as polymer/PtNPs modified electrodes are not entirely transport controlled by the catalytic electron-transfer kinetics. In order to estimate the rate constants (k_{obs}) and the number of electrons transferred (n), the Koutecky–Levich equation and the linear Koutecky–Levich plots for several NADH concentrations have been used [42]. At all instances, the calculated value of n obtained (Fig. 4A) was close to 2 clearly demonstrating

that the electrocatalytic oxidation of NADH on the polymer/Pt as well as on polymer/PtNPs/Pt is a two-electron transfer process. The values of k_{obs} obtained (Table 1) were dependent on NADH concentration for all the modified electrodes (Fig. 4B), in accordance with the literature about NADH mediator-modified electrodes [43]. This dependence has been explained by the formation of a charge transfer complex, before the formation of the reaction products by a reaction mechanism closely related to Michaelis–Menten kinetics:



where the heterogeneous second-order reaction rate, k_{obs} , can be expressed for any NADH concentration as:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{+2}}{K_M + [\text{NADH}]} \quad (3)$$

Consequently, inverting Eq. (3), plots of $1/k_{\text{obs}}$ vs. the NADH concentration must be linear (Fig. 4B) and the values of k_{+2} and K_M can be calculated from the slopes and the intercepts of these graphs respectively. The obtained values (Table 1) are comparable or higher than the values for other mediator-electrode systems [44]. Observe that the k_{obs} does not change substantially, nonetheless, the turnover numbers (k_{+2}) for the polymer/PtNPs/Pt electrodes have increased in relation to the polymer/Pt electrodes, indicating that the second stage of sequence (2) becomes faster for the nanostructured surface electrodes, suggesting a synergic effect of PtNPs with the interacting ferrocenes. Moreover, the k_{+2} of PMDUS/PtNPs/Pt electrode is greater than that of the PDAMS device, so the PMDUS polymer, with longer branches, will be interesting in order to develop NADH-dependent applications. In the other hand, the apparent Michaelis–Menten constants increase in the same way than the turnover numbers, balancing their weight on the overall reaction rate. This increase must be interpreted in terms of diffusion limitations through the films, which is a consequence of a more compact PMDUS film, and that will result in larger linear ranges in the calibrate plots.

Fig. 5 shows the amperometric responses of polymer/Pt and polymer/PtNPs/Pt electrodes to successive additions of 0.10 mM of NADH at an applied potential of +0.5 V. In accordance with the kinetic studies, the polymer/PtNPs/Pt electrodes show a better response and a wider linear range than the polymer/Pt electrodes. Also the best sensitivity of PDAMS polymer is in good agreement with its rougher morphology, although PMDUS polymer offers the best linear range, because its more compact structure limits the NADH diffusion through the film. The insets in Fig. 5A and B show how the anodic current reached a steady state within 5 s in all cases. The responses displayed two wide linear concentration ranges, as observed by other authors [18], both with good correlation coefficients and competitive sensitivities (Table 1) with other NADH electrochemical sensors (Table S1 – Supporting information).

Another highly interesting feature is the absence of fouling associated with the adsorption of reaction products. The amperometric response was highly stable in all the experiments. The stability of the modified electrodes was examined by performing successive amperometric measurements at pH 7.0, and also after storages up to two months and no change was detected. If the electrodes had been stored, they were pre-treated with five potential cycles between 0.0 and 0.6 V (vs. SCE), in phosphate buffer (pH = 7.0)/NaClO₄ 0.1 M solution, at 100 mV s⁻¹ prior to use.

3.3. ADH/polymer/PtNPs/Pt biosensors

The successful performance of the polymer/PtNPs/Pt electrodes for the amperometric detection of NADH, led us to develop ADH electrochemical biosensors based on the enzyme incorporation onto the polymer/PtNPs/Pt electrodes by covalent cross-linking.

Table 1
Kinetic and analytical parameters^a of modified electrodes for the oxidation of NADH.

	PDAMS/Pt	PDAMS/PtNPs/Pt	PMDUS/Pt	PMDUS/PtNPs/Pt
$10^3 k_{\text{obs, [NADH]=0}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	3.6	4.8	3.6	4.1
k_{+2}, s^{-1}	19.6	42.8	21.6	65.4
K_M, mM	5.4	8.9	6.0	16.0
Linear ranges, μM	70–400	87–700	0–300	0–800
	400–900	700–2500	300–1600	800–2100
Correlation coefficients, r	0.9925	0.9970	0.9995	0.9985
	0.9915	0.9979	0.9990	0.9984
Sensitivity (slopes-A), mA M cm^{-2}	15.86	68.24	1.32	40.21
	6.76	42.57	1.06	24.73
Intercepts, μA	5.65×10^{-2}	0.4327	8.60×10^{-5}	7.51×10^{-2}
	0.31	2.099	7.82×10^{-3}	1.29
Detection limit, μM	1.56	4.78	56.17	6.18

^a Obtained and/or calculated from measures at 0.5 V vs. SCE.

The effect of the NAD^+ concentration on the amperometric response to alcohol was previously investigated with NAD^+ solutions ranged between 0.5 mM and 5.0 mM. The optimal NAD^+ concentration was found to be 1 mM, and concentrations higher

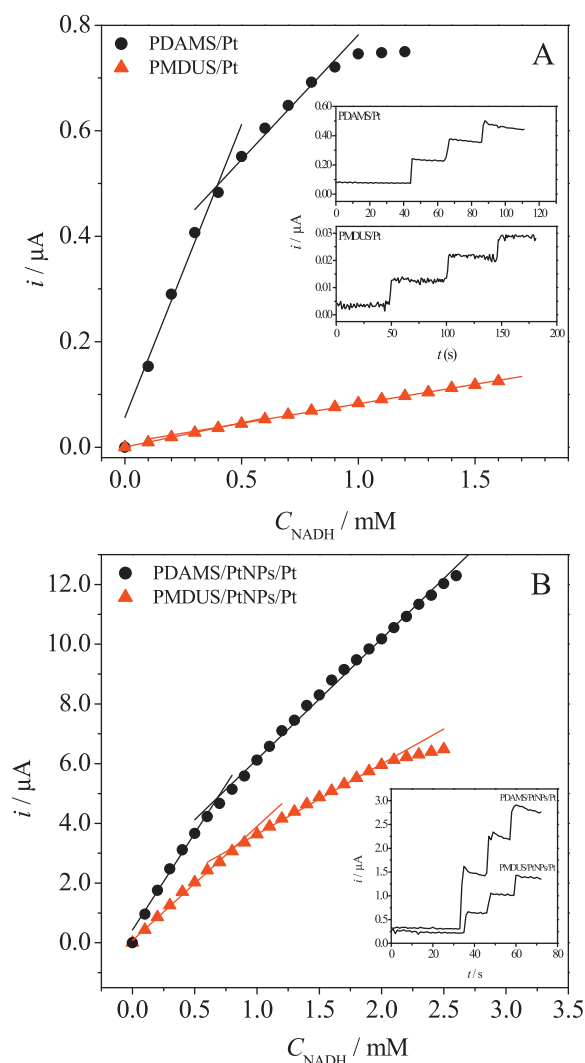


Fig. 5. Plots of chronoamperometric currents vs. NADH concentration of rotating PDAMS/Pt ($\Gamma = 2.60 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) and PMDUS/Pt ($\Gamma = 1.69 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (A), and PDAMS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 2.50 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) and PMDUS/PtNPs/Pt ($\Gamma = 5.50 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) electrodes (B) at applied potential of 0.5 V, in deaerated phosphate buffer (pH 7.0)/ NaClO_4 0.1 mol L⁻¹ solution and rotation speeds of 500 rpm. The insets are the corresponding amperometric responses of the same electrodes to successive additions of 0.1 mM NADH.

than 3.0 mM start to reveal the inhibitory effect produced by high cofactor concentrations [36].

The majority of authors assume that, unlike other ADHs, ethanol is by far the best substrate of the ADH from yeast, and methanol is a very poor substrate. Often is cited that the methanol activity of these enzyme is only 0.07% of its ethanol activity under identical conditions [45]. Generally, all data on methanol activity of alcohol dehydrogenases are expressed as the ratio of methanol activity to the corresponding ethanol activity, and this has contributed considerably to the general belief that yeast ADH is inactive with methanol. For this reason, the majority of alcohol biosensors are focused in the ethanol determination and only a few authors use ADH for the methanol oxidation [46,47] and none of them is focused as methanol sensor. The developed ADH/polymer/PtNPs/Pt biosensors showed a surprising behaviour with respect to methanol oxidation. As Fig. 6 shows, the ADH/PDAMS/PtNPs/Pt biosensor (as well as the ADH/PMDUS/PtNPs/Pt) has a greater response to methanol than to ethanol when ADH is present. For the first time, to the authors' knowledge, an ADH biosensor is more efficient in methanol than ethanol measurements. Although this behaviour has been previously observed with alcohol oxidase (enzyme with broad substrate specificity) [48,49], never so far has been with ADH. Nonetheless, it has been demonstrated [45] that this enzyme is able to oxidize methanol by NAD^+ to formaldehyde and NADH, but the enzymatic reaction is very complex due to interference of numerous side reactions. Already in 1970, Mani et al. [50], demonstrated

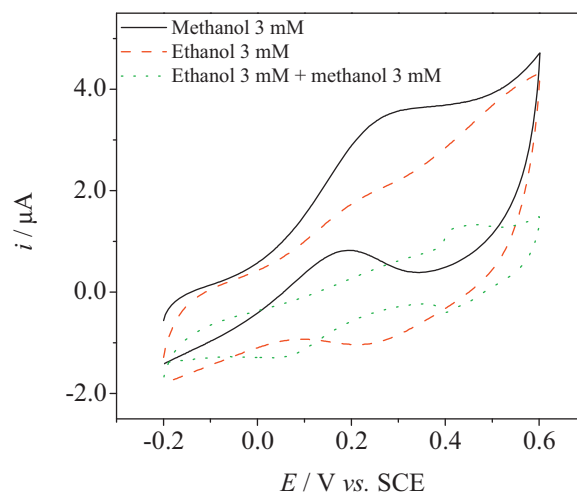


Fig. 6. Cyclic voltammograms showing the responses of a PDAMS/PtNPs/Pt ($\Gamma_{\text{eff}} = 9.6 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) modified electrode (dotted line), and an ADH/PDAMS/PtNPs/Pt biosensor ($\Gamma_{\text{eff}} = 6.2 \times 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (solid and dashed lines) to the presence of methanol and ethanol in deaerated phosphate buffer (pH 7.0)/ NaClO_4 0.1 M solution. $[\text{NAD}^+] = 1 \text{ mM}$. Scan rate: 5 mV s^{-1} .

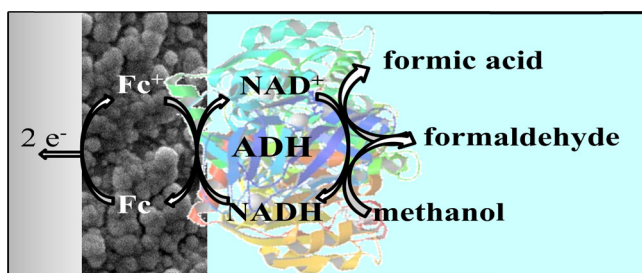


Fig. 7. Representation of the oxidation of methanol and formaldehyde on the ADH/polymer/PtNPs/Pt biosensors.

that ADH from yeast catalyzes the dehydrogenation of methanol to formaldehyde, and held that the specificity of ADH from yeast, from horse liver and from human liver with respect to methanol is identical. K_M for methanol of yeast ADH is about 40 times higher than that of ADH from other sources but the turnover numbers, k_{+2} , for methanol are almost identical, while for ethanol are very different with the enzymes from several sources. In the other hand, it is known that formaldehyde is also dehydrogenated in the presence of yeast ADH and NAD^+ to form the corresponding carboxylic acids (see Fig. 7). Mani et al. [50] proved that the rate of formaldehyde disappearance increases with the increase of the ADH concentration faster than the rate of methanol oxidation does.

In our case, the enzyme is immobilized on the electrode surface by polymerizing covalent bonds, and its surface concentration is high. The oxidation of formaldehyde requires the NAD^+ cofactor, and the heart of the matter is whether the electrochemical oxidation of $NADH$ is fast enough to provide *in situ* NAD^+ for the enzymatic irreversible oxidation of formaldehyde to formic acid avoiding the formaldehyde – methanol competition for the same enzyme site. Fig. 6 allows us to infer that the formaldehyde competition is minimized at ADH/polymer/PtNPs/Pt electrodes, and that the $NADH$ oxidation by the interacting ferrocenes in PDAMS and PMDUS polymers is fast enough.

From Fig. 6 we can also deduce that the working potential for measuring the alcohols can be lowered in comparison with the direct $NADH$ detection in the polymer/PtNPs/Pt electrodes, and the amperometric measurements demonstrate that the sensitivity does not improve significantly for working potentials beyond +0.25 V vs. SCE. This improvement in the overpotential of $NADH$ oxidation supports the hypotheses of the *in situ* formation of $NADH$ as a product of the enzymatic reaction, close to the ferrocene centres that oxidize it immediately through the reaction mechanism (2), and the fast consumption, *in situ* too, of the product of the electrochemical reaction, NAD^+ , by the enzymatic reaction (Fig. 7).

To explain why methanol is better catalyzed than ethanol we must consider the heterogeneous condition of the enzymatic oxidation of alcohols at the biosensors developed. The alcohol molecule must find the active site of the enzyme together with NAD^+ to form the ternary complex through the ADH–BSA–glutaraldehyde film, which is over the nanostructured and uneven polymer/PtNPs electrode surface. In order to determine if methanol diffuses better than ethanol through the enzyme layer and which polymer is the best as enzyme support and mediator, we have studied the kinetics of biosensors prepared with both PDAMS and PMDUS polymers.

The respective apparent rate constants, k_{app} , and the equivalent Michaelis constants, K'_M , were estimated from the corresponding double reciprocal Lineweaver–Burk plots at +0.25 V vs. SCE (Fig. S3 – Supporting information). Note that the overall apparent constant includes all the intrinsic constants together with the substrate and coenzyme diffusion outside and inside the film, the enzyme catalysis, electron mediation, electron transfer and electrolysis, and they provide the assessment of new devices.

The obtained kinetic constants (Table 2) confirm the best activity of ADH for methanol, since the overall apparent rate constant, k_{app} , for methanol is higher than for ethanol in both biosensors. However the K'_M are very close for the ADH/PMDUS/PtNPs/Pt electrode, but different for the ADH/PDAMS/PtNPs/Pt electrode. These dissimilar behaviours must be related to the different structure of the polymers and the diffusion of alcohols with different sizes through the nanostructured material. The different morphologies of the PDAMS and PMDUS films condition the conformation of the enzymatic layer, resulting in an additional mass transport limitation with PMDUS. Consequently, it can be expected that the diffusion is better for methanol than for ethanol in the PMDUS biosensor. If the diffusion of alcohols is not very hindered (PDAMS case), the differences in the ethanol and methanol intrinsic K_M of ADH are reflected in the apparent K'_M values, but if the diffusion of both is very hindered (PMDUS case), methanol diffusion must be comparatively easier. This theory is supported by the wider linear range obtained with the PMDUS biosensor (Table 2). In addition, a 2 mM aliquot of ethanol added to a 4 mM methanol solution, only increased the current in a 10% of the respective to the same concentration of methanol, indicating that methanol causes a competitive inhibition of ethanol in these devices.

Fig. 8 shows the calibration plots of both ADH/polymer/PtNPs/Pt biosensors for several alcohols and their amperometric responses (insets in Fig. 8A and B) to the successive additions of methanol and ethanol in phosphate buffer (pH 7.0). In the same way that in the direct $NADH$ determination, the responses displayed two linear ranges of concentration. From Fig. 8 and the analytical parameters shown in Table 2 it can be seen that PMDUS/PtNPs/Pt biosensor exhibits faster response time (in accordance with the obtained k_{+2} values), wider linear range for both ethanol and methanol determination, and lower detection limit (calculated as twice the standard deviation of the background noise) for methanol than PDAMS/PtNPs/Pt biosensor. These facts lead us to think that PMDUS is a somewhat better dehydrogenase bioelectrocatalyst than PDAMS, in agreement with the results obtained in the direct response to $NADH$ of modified electrodes without the enzyme.

The methanol results cannot be compared with other reported ones, because it is the first time that an ADH biosensor is more efficient in methanol than ethanol measurements, but the obtained results are promising because of their wide linear ranges, low working potential, fast response time and detection limits (see Table S2 – Supporting information for ethanol).

In relation to the selectivity to other substrates, the response to 1-butanol and 2-propanol was examined. The results (Fig. 8) indicate that the response of the biosensors decreases as the size of the alcohol increases, and the secondary alcohol also has a very low signal, which is in good agreement with the described selectivity of ADH.

The operational stability of the biosensors was examined by their responses to successive additions of methanol, and the relative standard deviation was 2.0% and 2.1% for ADH/PMDUS/PtNPs/Pt and ADH/PDAMS/PtNPs/Pt respectively ($n=5$). The electrode-to-electrode reproducibility was also examined for five different electrodes for each polymer, in a methanol solution 2.0 mM, and the relative standard deviation was calculated to be 3.5% and 4.0% for PMDUS and PDAMS respectively. The stability of the biosensors, evaluated by intermittent measurements in presence of methanol 2.0 mM, was different for each polymer. The ADH/PMDUS/PtNPs/Pt response remains stable and only an 8% reduction in the oxidation current was observed for electrodes stored in ultrapure water at 4 °C after three weeks. However a 65% decrease of the initial methanol response was observed for the ADH/PDAMS/PtNPs/Pt after one day stored, and an 80% after the second day. This behaviour reflects the different adherence of ADH over the two polymers. PMDUS, a denser and smoother polymer,

Table 2
Kinetic and analytical parameters^a of enzyme electrodes for the oxidation of methanol and ethanol.

	ADH/PDAMS/PtNPs/Pt		ADH/PMDUS/PtNPs/Pt	
	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
$10^5 k_{app}, A M^{-1}$	11.0	3.2	11.0	3.2
K_M, mM	39.7	15.6	31.6	39.7
Linear ranges, mM	1.2–8.0	0.9–7.0	2.6–12.6	1.4–10.0
	8.0–30.0	7.0–18.0	12.6–30.0	10.0–30.0
Correlation coefficients, r	0.9981	0.9948	0.9981	0.9982
	0.9998	0.9983	0.9983	0.9992
Sensitivity (slopes-A), $mAM^{-1} cm^{-2}$	0.957	0.233	0.756	0.260
	0.713	0.114	0.526	0.173
Intercepts, μA	2.08×10^{-2}	5.54×10^{-3}	8.79×10^{-2}	7.95×10^{-3}
	0.20	8.26×10^{-2}	0.36	9.38×10^{-2}
Response time, s	60	60	2	2
Detection limit, μM	127.6	451.6	80.6	546.6

^a Obtained and/or calculated from measures at 0.25 V vs. SCE.

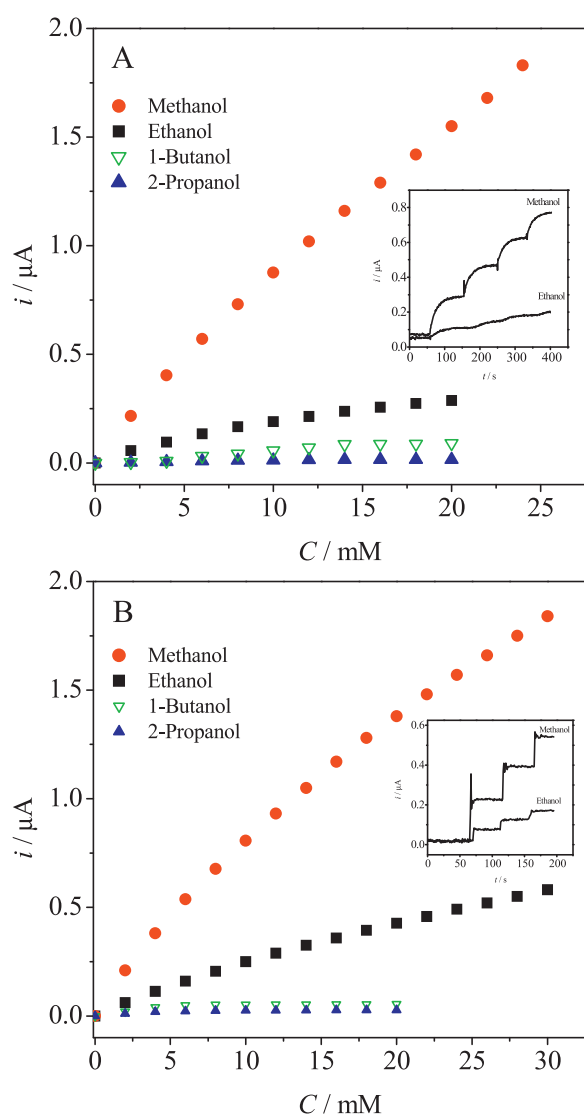


Fig. 8. Calibration curves for several alcohols at ADH/PDAMS/PtNPs/Pt ($I_{eff} = 6.2 \times 10^{-10} mol Fc cm^{-2}$) (A) and ADH/PMDUS/PtNPs/Pt ($I_{eff} = 2.8 \times 10^{-10} mol Fc cm^{-2}$) (B) rotating biosensors in deaerated phosphate buffer (pH 7)/NaClO₄ 0.1 M containing NAD⁺ 1.0 mM. $E = +0.25 V$ (vs. SCE) and $\omega = 500 rpm$. Insets are the amperometric responses of biosensors to successive additions of 2 mM of each alcohol.

offers a surface support for ADH more adherent and lets a better ADH-mediator interaction than PDAMS. This difference could be partly responsible for different response time observed at PDAMS and PMDUS biosensors.

3.4. Determination of the alcohol in real samples and interferences

The discrimination of methanol and ethanol is particularly important to detect falsified alcoholic beverages. In adulterated beverages, methanol is used instead of ethanol because methanol is cheaper but it is very toxic to humans. The developed biosensors measure both alcohols together but, for this purpose, we take advantage of the different slopes of calibration plots of both alcohols with the ADH/PMDUS/PtNPs/Pt electrode, at two different working potentials. Really, slopes at +0.25 and +0.55 V are practically the same for methanol, while they are quite different for ethanol. The linear equations at 250 mV for methanol and ethanol were $I (\mu A) = 0.0387 + 0.0513C$ (mM) ($R = 0.9982$) and $I (\mu A) = 0.0216 + 0.0324C$ (mM) ($R = 0.9992$) respectively. Real samples of non-alcoholic beer and red wine (12% v/v ethanol) were used as background in order to detect possible interferences. The beer was analyzed directly and spiked with methanol or ethanol at concentration levels similar to the ethanol concentration usually found in regular beer (5%, v/v) and the red wine was spiked with 2% v/v methanol.

The amperometric determinations of ethanol and methanol were carried out in stirred solutions at +0.25 and +0.55 V and by the standard additions method, involving the addition of ethanol and methanol aliquots from a stock $2.0 \times 10^{-4} M$. The results are shown in Table 3. It can be seen that the results detected by the ADH/PMDUS/PtNPs/Pt electrode show successful discrimination of methanol and ethanol, even in the presence of other possible interfering substances in these complex environments. These results indicate that the method presented in this work allows carrying out simple analysis with no pre-treatment of beverage samples.

Applications of the described modified electrodes in the clinical diagnosis field are out of the aim of this work, nevertheless we have evaluated the effect of 0.2 mM interfering substances commonly present in biological samples. From earlier studies with PDAMS and PMDUS modified electrodes [27], we confirmed that the electro-oxidation of principal interfering agents in biological samples, ascorbic acid (AA), uric acid (UA) and p-acetaminophenol (ACE) occur at potentials more positive than +0.1 V interfering the signal when are present. These interferences and others as due to glutathione (GSH), dopamine (DA) or epinephrine (EP), have been avoided by means of an additional thin film of the widely used Nafion polymer in the same way as other authors [15,27,36].

Table 3

Results for the determination of methanol and ethanol in real samples using ADH/PMDUS/PtNPs/Pt electrode. Mean values for five measurements.

Analyzed sample	Nominal or spiked (mM)		Found (mM)		Recovery (%)	
	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
NAB	–	0.0	0.0 ± 0.07	0.0 ± 0.02	100 (±0.07)	100 (±0.02)
NABM	4.0	–	3.9 ± 0.1	0.0 ± 0.05	97.5 (±0.1)	100 (±0.05)
NABE	–	4.0	0.0 ± 0.09	4.2 ± 0.1	100 (±0.09)	105 (±0.09)
WM	3.0	12.4	2.9 ± 0.08	12.3 ± 0.1	96.7 (±0.08)	99.2 (±0.1)

4. Conclusions

This work demonstrated that films of two hyperbranched redox polymers, PDAMS and PMDUS, functionalized with interacting ferrocenes, electrodeposited on Pt nanoparticles have improved the ability for promoting electron transfers between the redox polymer and the electrode surface. The two polymer/PtNPs/Pt electrodes have been successfully used as electrochemical sensors in the electrocatalytic oxidation of NADH and compared with the corresponding polymer-coated Pt electrodes. The rate constants, linear ranges, and sensitivities obtained with the polymer/PtNPs/Pt electrodes are improved in relation with the polymer electrodes, revealing a synergistic effect of interacting ferrocenes and the PtNPs, which facilitates a high catalytic activity towards NADH and a large active surface area. Both polymers were also capable to protect the electrode surface from the NADH surface fouling effect. The obtained results were comparable and in most cases better than those previously found for electrodes modified with other mediators. With regard to the structure of the hyperbranched polymers and their films, the polymer with shorter branches and which affords rougher films, PDAMS, exhibits slightly higher k_{obs} and sensitivity and smaller K'_M , indicating a better electrocatalytic activity. The PMDUS polymer, with longer and more flexible branches, but affording denser films, showed a wider linear range and higher k_{+2} . These results indicate that the catalytic efficiency of polymers possibly will be dependent on the substrate–analyte characteristics.

In addition, the polymer/PtNPs/Pt electrodes give the attractive possibility of lowering the potential of the NADH oxidation making them extremely promising candidates to serve as the electrochemical support for the incorporation of dehydrogenase enzymes. In this way, we have developed alcohol biosensors with ADH, as model enzyme, covalently immobilized by crosslinking onto polymer/PtNPs/Pt surfaces. The ADH/polymer/PtNPs/Pt electrodes were more efficient in the oxidation of NADH produced by the enzymatic reaction into the film than of NADH in solution, allowing a lowering in the working potential to +0.25 V vs. SCE. Biosensors prepared with both polymers were used successfully for methanol, with linear ranges up to 30 mM and sensitivities 0.957 and 0.756 mA M⁻¹ cm⁻² for PDAMS and PMDUS respectively, and overall rate constants 3.4-fold with respect to those of ethanol. The enzyme electrodes were also sensitive to ethanol in a similar linear range but the obtained sensitivities were smaller than with methanol. In any case, the enzyme electrodes provide sensitivities and behaviours linear enough to quantify methanol or ethanol in real samples in several fields. In relation with the influence of their structure, ADH/PDAMS/PtNPs/Pt electrodes provided a somewhat better sensitivity, while ADH/PMDUS/PtNPs/Pt electrodes were faster (2 s vs. 60 s) and showed a lower detection limit (80 μM for methanol) and better linear ranges. The ADH biosensors developed in this work exhibit valuable kinetic and analytical characteristics and offer the novelty of measuring methanol efficiently at a low potential (+0.25 V) in neutral pH media. The prepared ADH/PMDUS/PtNPs/Pt biosensor is valid for the analysis of methanol and ethanol in beverages.

Acknowledgment

The authors thank the Spanish Dirección General de Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Project No. CTQ-2009-12332-C02) for financial support of this research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.072>.

References

- [1] L. Gorton, E. Domínguez, *Electrochemistry of NAD(P)⁺/NAD(P)H*, in: A.J. Bard, M. Stratmann (Eds.), *Encyclopedia of Electrochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, pp. 67–143.
- [2] L. Gorton, E. Domínguez, *Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes*, *Reviews in Molecular Biotechnology* 82 (2002) 371–392.
- [3] A. Radoi, D. Compagnone, *Recent advances in NADH electrochemical sensing design*, *Bioelectrochemistry* 76 (2009) 126–134.
- [4] B.A. Deore, M.S. Freund, *Reactivity of poly(anilineboronic acid) with NAD(+) and NADH*, *Chemistry of Materials* 17 (2005) 2918–2923.
- [5] B. Ge, Y. Tan, Q. Xie, M. Ma, S. Yao, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 547–554.
- [6] C.M. Maroneze, L.T. Arenas, R.C.S. Luz, E.V. Benvenutti, R. Landers, Y. Gushikem, *Meldola blue immobilized on a new SiO₂/TiO₂/graphite composite for electrocatalytic oxidation of NADH*, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 4167–4175.
- [7] L. Zhu, R.J. Yang, X. Jiang, D. Yang, *Amperometric determination of NADH at a Nile blue/ordered mesoporous carbon composite electrode*, *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 530–533.
- [8] M.A. Ghanem, J.M. Chretien, J.D. Kilburn, P.N. Bartlett, *Electrochemical and solid-phase synthetic modification of glassy carbon electrodes with dihydroxybenzene compounds and the electrocatalytic oxidation of NADH*, *Bioelectrochemistry* 76 (2009) 115–125.
- [9] A. Salimi, R. Hallaj, M. Ghadermazi, *Modification of carbon ceramic electrode with sol-gel technique by a thin film of chlorogenic acid application to amperometric detection of NADH*, *Talanta* 65 (2005) 888–894.
- [10] S. Serban, N. El Murr, *Synergistic effect for NADH oxidation of ferrocene and zeolite in modified carbon paste electrodes. New approach for dehydrogenase based biosensors*, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 161–166.
- [11] H. Zheng, J. Zhou, J. Zhang, R. Huang, H. Jia, S. Suye, *Electrical communication between electrode and dehydrogenase by a ferrocene-labeled high molecular-weight cofactor derivative: application to a reagentless biosensor*, *Microchimica Acta* 165 (2009) 109–115.
- [12] E. Al-Jawadi, S. Pöller, R. Haddad, W. Schuhmann, *NADH oxidation using modified electrodes based on lactate and glucose dehydrogenase entrapped between an electrocatalyst film and redox catalyst-modified polymers*, *Microchimica Acta* 177 (2012) 405–410.
- [13] M.T. Meredith, F. Giroud, S.D. Minter, *Azine/hydrogel/nanotube composite-modified electrodes for NADH catalysis and enzyme immobilization*, *Electrochimica Acta* 72 (2012) 207–214.
- [14] S. Prasannakumar, R. Manjunatha, C. Nethravathi, G.S. Suresh, M. Rajamathi, T.V. Venkatesha, *Graphene-carbon nanotubes modified graphite electrode for the determination of nicotinamide adenine dinucleotide and fabrication of alcohol biosensor*, *Journal of Solid State Electrochemistry* 16 (2012) 3189–3199.
- [15] H. Qiu, L. Xue, G. Ji, G. Zhou, X. Huang, Y. Qu, P. Gao, *Enzyme-modified nanoporous gold-based electrochemical biosensors*, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3014–3018.
- [16] L. Tang, G. Zeng, G. Shen, Y. Zhang, Y. Li, Ch. Fan, C. Liu, Ch. Niu, *Highly sensitive sensor for detection of NADH based on catalytic growth of Au nanoparticles on glassy carbon electrode*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (2009) 1677–1684.
- [17] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode*, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 4007–4012.
- [18] H. Teymourian, A. Salimi, R. Hallaj, *Low potential detection of NADH based on Fe₃O₄ nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes composite: Fabrication of integrated dehydrogenase-based lactate biosensor*, *Biosensors and Bioelectronics* 33 (2012) 60–68.

- [19] 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* 181 (2013) 280–287.
- [20] H. Mao, Y. Li, X. Liu, W. Zhang, C. Wang, S.S. Al-Dehay, M. El-Newehy, The application of novel spindle-like polypyrrole hollow nanocapsules containing Pt nanoparticles in electrocatalysis oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), *Journal of Colloid and Interface Science* 356 (2011) 757–762.
- [21] H.-K. Song, S.H. Lee, K. Won, J.H. Park, J.K. Kim, H. Lee, S.-J. Moon, D.K. Kim, Ch.B. Park, Electrochemical regeneration of NADH enhanced by platinum nanoparticles, *Angewandte Chemie International Edition* 47 (2008) 1749–1752.
- [22] I. Ali, A. Gill, S. Omanovic, Direct electrochemical regeneration of the enzymatic cofactor 1,4-NADH employing nano-patterned glassy carbon/Pt and glassy carbon/Ni electrodes, *Chemical Engineering Journal* 188 (2012) 173–180.
- [23] M. Senel, E. Cevik, M.F. Abasiyanik, Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator, *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 444–450.
- [24] M.P. García Armada, J. Losada, F.J. López-Villanueva, H. Frey, B. Alonso, C.M. Casado, Electrochemical and bioelectrocatalytic properties of novel block-copolymers containing interacting ferrocenyl units, *Journal of Organometallic Chemistry* 693 (2008) 2803–2811.
- [25] C.M. Casado, B. Alonso, J. Losada, M.P. García-Armada, in: S. Campagna, P. Ceroni, F. Puntoriero (Eds.), *Designing Dendrimers*, John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, 2012, pp. 219–262.
- [26] G. de la Cruz, H. Schüle, J. Losada, M.P. García-Armada, H. Frey, B. Alonso, C.M. Casado, Electrocatalytic properties of carbosilane-based hyperbranched polymers functionalized with interacting ferrocenyl units, *European Journal of Inorganic Chemistry* 2013 (2013) 44–53.
- [27] M.P. García Armada, A. Jiménez, J. Losada, B. Alonso, C.M. Casado, New carbosilane polymers with interacting ferrocenes as support and bioelectrocatalysts of oxidases to develop versatile and specific amperometric biodevices, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 (2012) 1778–1791.
- [28] S.Z. Bas, H. Gülce, S. Yildiz, Amperometric xanthine biosensors based on electrodeposition of platinum on polyvinylferrocenium coated Pt electrode, *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic* 72 (2011) 282–288.
- [29] T. Huang, R. Jiang, D. Zhang, J. Zhuang, W. Cai, A. Yu, AC impedance investigation of plating potentials on the catalytic activities of Pt nanocatalysts for methanol electrooxidation, *Journal of Solid State Electrochemistry* 14 (2010) 101–107.
- [30] J. Losada, M.P. García Armada, A glucose amperometric sensor based on covalent immobilization of glucose oxidase in poly-2-aminoaniline film via chloranil on platinized platinum electrode, *Electroanalysis* 9 (1997) 1416–1421.
- [31] F. Salimi, M. Negahdary, G. Mazaheri, H. Akbari-dastjerdi, Y. Ghanbari-kakavandi, S. Javadi, S. Inanloo, M. Mirhashemi-route, M. Shokooohnia, A. Sayad, A novel alcohol biosensor based on alcohol dehydrogenase and modified electrode with ZrO₂ nanoparticles, *International Journal of Electrochemical Science* 7 (2012) 7225–7234.
- [32] Ch.-A. Lee, Y.-Ch. Tsai, Preparation of multiwalled carbon nanotube–chitosan–alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol, *Sensors and Actuators B* 138 (2009) 518–523.
- [33] C. Schlagen, M. Hämmerle, R. Moos, Amperometric enzyme electrodes for the determination of volatile alcohols in the headspace above fruit and vegetable juices, *Microchimica Acta* 179 (2012) 115–121.
- [34] P. Luo, Y. Liu, G. Xie, X. Xiong, S. Deng, F. Song, Determination of serum alcohol using a disposable biosensor, *Forensic Science International* 179 (2008) 192–198.
- [35] G. Tayhas, R. Palmore, H. Bertschy, S.H. Bergens, G.M. Whitesides, A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 443 (1998) 155–161.
- [36] M. Zhou, L. Shang, B. Li, L. Huang, S. Dong, Highly ordered mesoporous carbons as electrode material for the construction of electrochemical dehydrogenase- and oxidase-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 442–447.
- [37] M.P. García Armada, J. Losada, I. Cuadrado, B. Alonso, B. González, E. Ramírez-Oliva, C.M. Casado, Electrodes modified with a siloxane copolymer containing interacting ferrocenes for determination of hydrogen peroxide and glucose, *Sensors and Actuators B* 88 (2003) 190–197.
- [38] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 101 (1979) 19–28.
- [39] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, second ed., John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [40] C.P. Andrieux, J.M. Savéant, Catalysis at redox polymer coated electrodes, in: R. Murray (Ed.), *Molecular Design of Electrode Surfaces*, Wiley Interscience, MI, USA, 1992, pp. 210–218.
- [41] V.G. Levich, *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA, 1962.
- [42] J. Koutecky, V.G. Levich, The application of the rotating disc electrode to studies of kinetic and catalytic processes, *Zhurnal Fizicheskoi Khimii* 32 (1958) 1565–1575.
- [43] F.D. Munteanu, L.T. Kubota, L. Gorton, Effect of pH on the catalytic electro-oxidation of NADH using different two-electron mediators immobilised on zirconium phosphate, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 509 (2001) 2–10.
- [44] P. Rodrigues, W.J. Rodrigues, A. Bof, M. Oliveira, L.T. Kubota, Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active (NC)₂C₆H₃–NHOH/(NC)₂C₆H₃–NO from 4-nitrophthalonitrile–(NC)₂C₆H₃–NO₂-modified electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 448–458.
- [45] V. Leskovic, S. Trivic, D. Pericin, The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research* 2 (2002) 481–494.
- [46] G.T.R. Palmora, H. Bertschy, S.H. Bergens, G.M. Whitesides, A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD(+)-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 443 (1998) 155–161.
- [47] S. Alpat, A. Telefoncu, Development of an alcohol dehydrogenase biosensor for ethanol determination with Toluidine Blue O covalently attached to a cellulose acetate modified electrode, *Sensors* 10 (2010) 748–764.
- [48] M. Hämmerle, K. Hilgert, M.A. Horn, R. Moos, Analysis of volatile alcohols in apple juices by an electrochemical biosensor measuring in the headspace above the liquid, *Sensors and Actuators B* 158 (2011) 313–318.
- [49] H.B. Yildiz, L. Toppare, Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 2306–2310.
- [50] J.C. Mani, R. Pietruszko, H. Theorell, Methanol activity of alcohol dehydrogenase from human liver, horse liver, and yeast, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 140 (1970) 52–59.

Biographies

Almudena Jiménez is a chemical engineer and she is currently working as process engineer in Foster-Wheeler Iberia, Spain.

M. Pilar García Armada is an associate professor in Politechnique University of Madrid. She received his Ph.D. degree in 1994 from National Distance Education University (UNED), Spain. His current research is focused on chemo/biosensing and electroanalytical chemistry, and electrochemical and spectral characterizations of chemo-/biosensing events.

José Losada is a professor in Politechnique University of Madrid. He received his Ph.D. degree in 1976 from Autonomia University of Madrid, Spain. His current research is focused on chemo/biosensing and electroanalytical chemistry, electrochemical and spectral characterizations of chemo-/biosensing events.

Carlos Villena is pursuing his Ph.D. in electroanalytical chemistry in Politechnique University of Madrid. His research interests include molecular recognition, electro- and biocatalysis and biosensors.

Beatriz Alonso received her Ph.D. from Universidad Autónoma de Madrid in 1997 with a Thesis on ferrocenyl dendrimers. She is currently associate professor at Department of Inorganic Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid. Her research interests are now mainly focused in metallodendrimer synthesis and their applications in redox sensing.

Carmen M. Casado received her Ph.D. in chemistry from Universidad Autónoma de Madrid in 1993. She is currently associate professor (permanent position) at the Inorganic Chemistry Department, Universidad Autónoma de Madrid. Her main research interests are redox-active organometallics and their applications as electrochemical sensors.

Supplementary data

Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles

Almudena Jiménez ^a, M. Pilar García Armada ^{a, *}, José Losada ^a, Carlos Villena ^a, Beatriz Alonso ^b, Carmen M. Casado ^b

^a Dpto. de Ingeniería Química Industrial, ETSII, UPM, José Gutiérrez Abascal n° 2, 28006-Madrid, Spain.

^b Dpto. de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, UAM, Francisco Tomás y Valiente n° 7, 28049-Madrid, Spain.

Tel.: +34 913 363 185, Fax: + 34 913363009

E-mail address: pilar.garcia.armada@upm.es

Preparation of polymer and polymer/PtNPs modified Pt electrodes

Prior to coating, Pt disk electrodes were polished using 0.1 μm alumina powder and rinsed in ultrapure water in an ultrasonic bath. Each electrode surface was then conditioned by cycling the potential in 0.5 M H_2SO_4 . Finally, the electrodes were rinsed successively with water and acetone and allowed to dry at room temperature. The Pt nanoparticles were prepared by cycling the Pt electrode in the potassium hexachloroplatinate (IV) solution in the scanning potential range from -0.25 to 0.6 V (vs. SCE) at a scan rate of 50 mV s^{-1} for 20 cycles [1]. The electrochemical active surface area (effective area) of new PtNPs/Pt electrodes was measured in accordance with [1]. The PtNPs/Pt electrodes were rinsed with phosphate buffer and acetone prior to polymer electrodeposition. The polymer films were electrodeposited onto Pt or PtNPs/Pt electrodes according to a previously published procedure [2,3] under potentiostatic control at +0.7 V (vs. Ag/AgCl). The coated electrodes were rinsed with dichloromethane and water.

Preparation of ADH/polymer/PtNPs modified Pt electrodes

The enzyme loading was optimized to c.a. 20 Units based on the slopes of the ethanol calibration graphs and having into account the relation sensitivity/costs in order to optimize them. The enzyme was immobilized onto the polymer/PtNPs/Pt electrodes by covalent cross-linking [4] by applying 6 μl of the resulting mixture of 100 μl of a 15 mg/ml ADH aqueous solution and 50 μl of a 1% (wt. %) aqueous solution of BSA. A 2 μl of aqueous solution of glutaraldehyde (40 mM) was further coated onto the electrodes and dried at 4 $^\circ\text{C}$ for 2 h. Finally the enzyme electrodes were kept in phosphate buffer for 15 min before use.

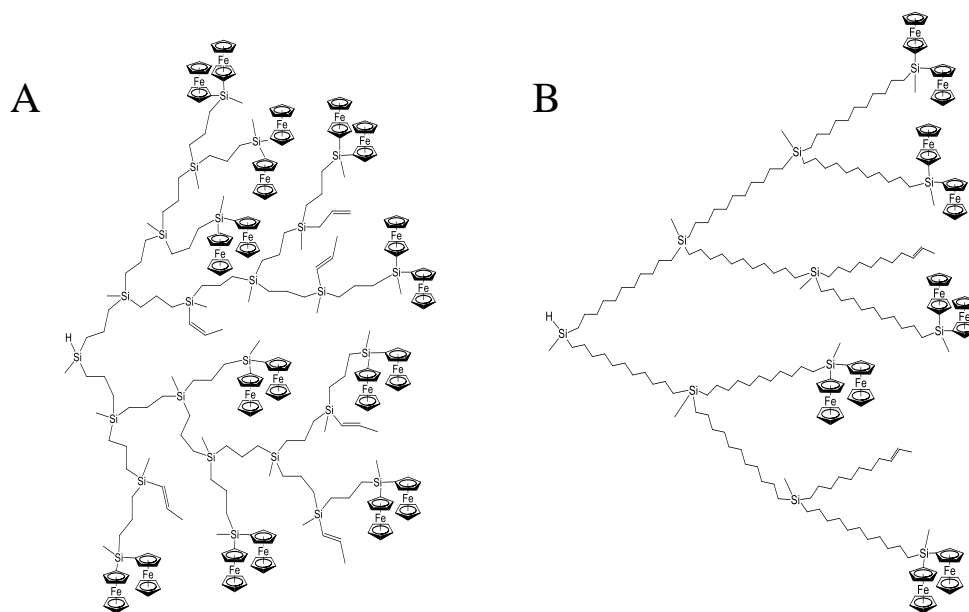


Fig. S1. Chemical structure of (A) polydiallylmethylsilane (PDAMS) and (B) polymethyldiundecenylsilane (PMDUS).

Electrocatalysis of NADH at polymer/Pt and polymer/PtNPs/Pt electrodes

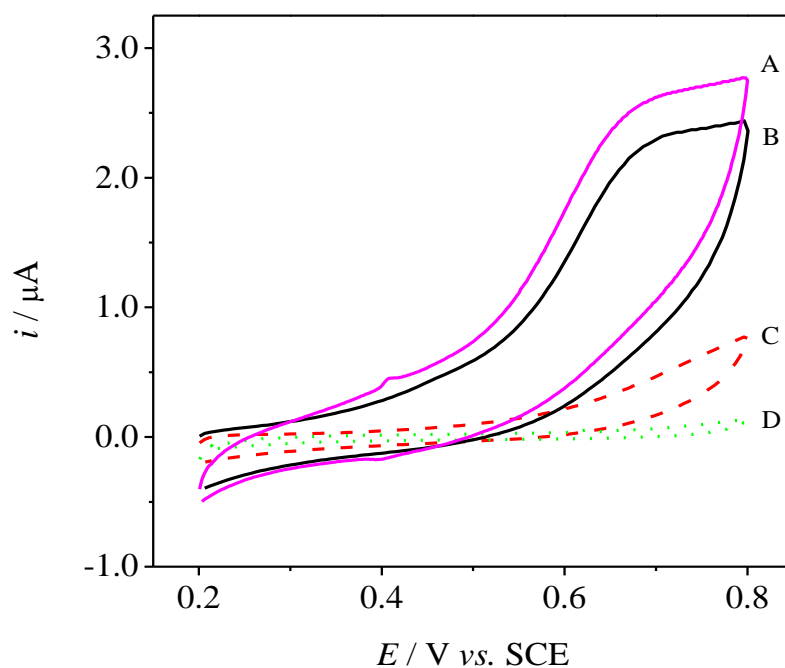


Fig. S2. Cyclic voltammograms of Pt disk electrodes modified with (A) PDAMS ($\Gamma = 4.5 \times 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2} thickness film) and (B) PMDUS ($\Gamma = 1.7 \times 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) in presence of NADH 0.5 mM. (C) CV of a platinum bare electrode in presence of NADH 0.5 mM. (D) CV of the same PMDUS/Pt electrode in absence of NADH. All the CVs were measured in deaerated phosphate buffer (pH 7.0) / NaClO_4 0.1 M. Scan rate: 5 mV s^{-1} .

Kinetic study of ADH/polymer/PtNPs/Pt biosensors.

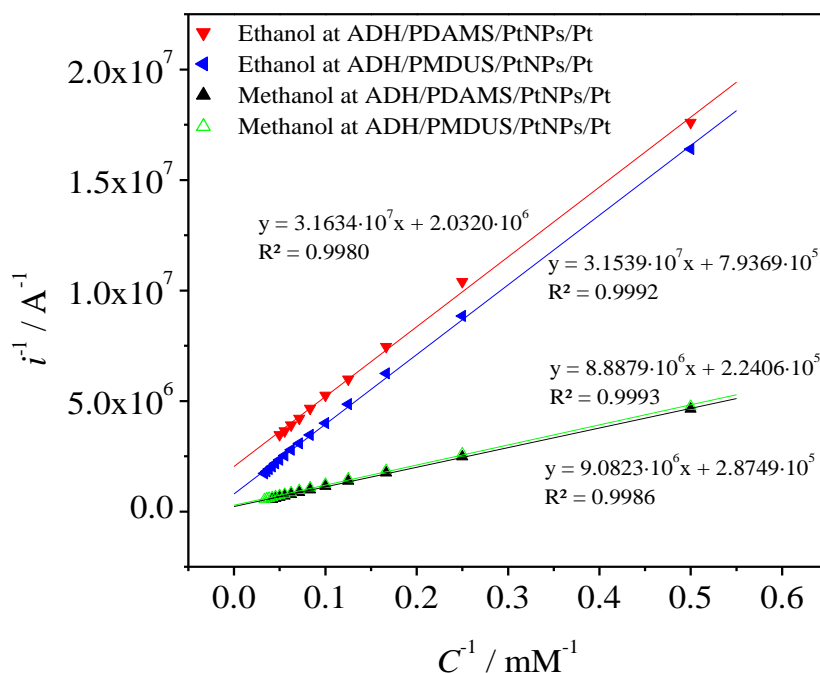


Fig. S3. Lineweaver-Burk plots of methanol and ethanol measured at +0.25 V vs. SCE with ADH/PDAMSr/PtNPs/Pt ($\Gamma_{\text{eff}} = 5.5 \times 10^{-10}$ mol Fc cm⁻²) and ADH/PMDUS/PtNPs/Pt ($\Gamma_{\text{eff}} = 3 \times 10^{-10}$ mol Fc cm⁻²) biosensors in deaerated phosphate buffer.

Applying the Savinell model [5], the linear Lineweaver-Burk plots indicate that neither the diffusion nor the electrolysis process controls the overall rate of the biosensors, and the overall reaction rate is limited by a combination of enzyme catalysis and electron mediation reactions. In these cases, the kinetic parameters can be calculated from the Lineweaver-Burk plots, with the slope equal to $1/k_{\text{app}}$ and the intercept equal to $1/k_{\text{app}} \times K'_M$, where k_{app} and K'_M are the apparent rate constant and the equivalent Michaelis constant, respectively, of the overall reaction. Notice that both parameters are constant for any specific enzyme electrode whose immobilized concentrations are fixed.

Table S1

Comparison of analytical performance of our proposed Polymer/PtNPs/Pt sensors with other published NADH sensors.

Electrode material	Applied potential (mV)	Linear range (mM)	Response time (s)	Detection limit (μM)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	Reference
Azine/hydrogel/MWCNT	100	0.0 – 0.5	—	—	41.7	[6]
MPECVD/C nanosheets	336	0.0 – 0.5	—	0.44	715	[7]
MWNTs/IL/Ox-P(NAD ⁺)	50	2×10 ⁻⁴ – 0.02	5	0.02	440	[8]
		0.02– 0.042			200	
Fe ₃ O ₄ /MWCNTs/GC	0.0	1 – 0.07	—	0.3	70	[9]
		0.07 – 0.3			35	
Gr/(PDDA/PSS-MWCNTs	70	0.025 – 0.25	< 3	0.1	55	[10]
Nafion/NPG/GCE	500	0.02 – 1.0	—	9.5	98.6	[11]
Nano-ZrO ₂ /PAF/GCE	400	1×10 ⁻³ – 0.1	—	1.0	5.2 ^a	[12]
PDAMS/PtNPs/Pt	500	8.7×10 ⁻² – 0.7	< 5	4.8	68.2	This work
		0.7– 2.5			42.6	
PMDUS/PtNPs/Pt	500	0.0 – 0.8	< 5	6.2	40.2	This work
		0.8 – 2.1			24.7	

^a Geometric area is unknown (unit = $\mu\text{A mM}^{-1}$).

Table S2

Comparison of analytical performance of our proposed ADH/Polymer/PtNPs/Pt sensors with other published ethanol biosensors.

Electrode material	Applied potential (mV)	Linear range (mM)	Response time (s)	Detection limit (μM)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	Reference
MWCNT-CHIT-ADH	700	none	—	0.52	164.6	[13]
MWNTs/IL/Ox-P(NAD ⁺)	100	5×10^{-3} – 0.06	10	0.5	13.1	[8]
		0.06 – 0.9			7.7	
Gr/(PDDA/PSS-MWCNTs)	100	0.025 – 0.20	60	9.6	66.5	[10]
Nafion/NPG/GCE	500	1 – 8	—	120	2.7	[11]
CA-TBO/ADH/GCE	-400	0.01 – 0.4		5.0	4.8	
Nano-ZrO ₂ /PAF/GCE	400	0.03 – 1.0	—	1.0	0.034 ^a	[12]
		1.0 – 12.0			0.006 ^a	
PDAMS/PtNPs/Pt	250	0.9 – 7.0	60	451.6	0.233	This work
		7.0– 18.0			0.114	
PMDUS/PtNPs/Pt	250	1.4 – 10.0	2	546.6	0.260	This work
		10.0 – 30.0			0.173	

References

- [1] T. Huang, R. Jiang, D. Zhang, J. Zhuang, W. Cai, A. Yu, AC impedance investigation of plating potentials on the catalytic activities of Pt nanocatalysts for methanol electrooxidation, *Journal of Solid State Electrochemistry* 14 (2010) 101–107.
- [2] G. de la Cruz, H. Schüle, J. Losada, M.P. García-Armada, H. Frey, B. Alonso, C.M. Casado, Electrocatalytic Properties of Carbosilane-Based Hyperbranched Polymers Functionalized with Interacting Ferrocenyl Units, *European Journal of Inorganic Chemistry* 2013 (2013) 44–53.
- [3] M.P. García Armada, A. Jiménez, J. Losada, B. Alonso, C.M. Casado, New Carbosilane Polymers with Interacting Ferrocenes as Support and Bioelectrocatalysts of Oxidases to Develop Versatile and Specific Amperometric Biodevices, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 (2012) 1778–1791.
- [4] M. Zhou, L. Shang, B. Li, L. Huang, S. Dong, Highly ordered mesoporous carbons as electrode material for the construction of electrochemical dehydrogenase- and oxidase-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 442–447.
- [5] Chi J. Chen, Chung C. Liu and Robert F. Savinell, Polymeric redox mediator enzyme electrodes for anaerobic glucose monitoring, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 348 (1993) 317–338.
- [6] M.T. Meredith, F. Giroud, S.D. Minter, Azine/hydrogel/nanotube composite-modified electrodes for NADH catalysis and enzyme immobilization, *Electrochimica Acta* 72 (2012) 207–214.
- [7] Z. Wang, M. Shoji, H. Ogata, Electrochemical determination of NADH based on MPECVD carbon nanosheets, *Talanta* 99 (2012) 487–491.
- [8] H. Teymourian, A. Salimi, R. Hallaj, Electrocatalytic oxidation of NADH at electrogenerated NAD⁺ oxidation product immobilized onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid nanocomposite: Application to ethanol biosensing, *Talanta* 90 (2012) 91–98.
- [9] H. Teymourian, A. Salimi, R. Hallaj, Low potential detection of NADH based on Fe₃O₄ nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes composite: Fabrication of integrated dehydrogenase-based lactate biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 33 (2012) 60–68.
- [10] S. Prasannakumar, R. Manjunatha, C. Nethravathi, G.S. Suresh, M. Rajamathi, T.V. Venkatesha, Graphene-carbon nanotubes modified graphite electrode for the determination of nicotinamide adenine dinucleotide and fabrication of alcohol biosensor, *Journal of Solid State Electrochemistry* 16 (2012) 3189–3199.
- [11] H. Qiu, L. Xue, G. Ji, G. Zhou, X. Huang, Y. Qu, P. Gao, Enzyme-modified nanoporous gold-based electrochemical biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3014–3018.
- [12] X. Liu, B. Li, M. Ma, G. Zhan, Ch. Liu, Ch. Li, Amperometric sensing of NADH and ethanol using a hybrid film electrode modified with electrochemically fabricated zirconia nanotubes and poly(acid fuchsin), *Microchimica Acta* 176 (2012) 123–129.
- [13] Ch.-A. Lee, Y.-Ch. Tsai, Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol, *Sensors and Actuators B* 138 (2009) 518–523.

ARTÍCULO 2

New acetaminophen amperometric
sensor based on ferrocenyl
dendrimers deposited onto Pt
nanoparticles

New acetaminophen amperometric sensor based on ferrocenyl dendrimers deposited onto Pt nanoparticles

M. Pilar García Armada¹ · Eduardo Vallejo¹ · Carlos Villena¹ · José Losada¹ · Carmen M. Casado² · Beatriz Alonso²

Received: 30 November 2015 / Revised: 13 January 2016 / Accepted: 17 February 2016 / Published online: 27 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract In this work, the electrocatalytic properties and kinetic characteristics of new electrodes modified with Pt nanoparticles (PtNPs) and three generations of ferrocene functionalized dendrimers have been investigated as new acetaminophen amperometric sensors. The catalytic synergy of PtNPs with the ferrocene groups is discussed in relation to the ferrocenyl dendrimer generation and their properties. The modified electrodes show excellent catalytic responses toward the oxidation of acetaminophen, with good reproducibility. The overpotential for oxidation of acetaminophen at pH 7 is decreased, and the current response significantly enhanced. The best dendrimer/PtNPs/Pt electrode shows several wide linear concentration ranges for the acetaminophen oxidation from 0 to beyond 17 mM. At 0.5 V vs. SCE, the first linear range extends from 0 to 100 μ M ($y = 0.0131x - 0.0028$; $R^2 = 0.9996$) and the last from 10 mM to at least 17 mM ($y = 0.0024x + 26.6$; $R^2 = 0.9977$). This fact turns the developed acetaminophen sensor in the device with the widest application range. In addition, the sensor allows measuring acetaminophen in the presence of interfering substances as glucose, dopamine, uric acid, and ascorbic acid, and it has been successfully applied to the determination of acetaminophen in three pharmaceutical formulations.

Keywords Electrochemical sensor · Pt nanoparticles · Acetaminophen · Dendrimers · Ferrocene

Introduction

Acetaminophen (paracetamol or N-acetyl-p-aminophenol) (AC) is a commonly used analgesic, and it is accepted globally in association with relief of headache, fever, cold, and neuralgia being a suitable alternative for the patients who are sensitive to aspirin. When used in proper therapeutic dose, AC is easily metabolized, but overdose leads to acute hepatic necrosis and many adverse effects including rashes, kidney damages, body dyscrasias, and pancreatitis [1]. Hence, it is vital to develop a sensitive technique for the quality control of AC in pharmaceutical formulations.

On the other hand, the presence of pharmaceuticals in the environment has received a lot of attention because they raise risks to the environment and concerns for human health [2]. AC is usually present in the effluent of sewage treatment plants and surface water from its manufacturing processes and the disposal of unused ones or human excretion.

The recent studies for acetaminophen detection have well demonstrated the advantage of electrochemical techniques [3] over other analytical methods, such as spectrophotometry [4, 5], titrimetry [6], chemiluminescence [7, 8], liquid chromatography [9], or capillary electrophoresis [10, 11]. The last approach in AC electrochemical sensing has incorporated metallic nanoparticles of platinum, gold [12–14], functionalized multi-walled carbon nanotube films [15] or complex nanocomposites as Pd/graphene oxide nanocomposite [16], highly loaded zirconium nanoparticles decorated reduced graphene oxide [17], or by co-depositing glutamic acid and gold nanoparticles on a single-walled carbon nanotube film [18].

✉ M. Pilar García Armada
pilar.garcia.armada@upm.es

¹ Dpto. Ingeniería Química Industrial y M. A., Universidad Politécnica de Madrid, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain

² Dpto. Química Inorgánica, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The gold nanoparticles improve the current of oxidation of the AC and move its oxidation potential with respect to the unmodified electrode, but they show poor mechanical properties and reproducibility problems due to their non homogeneous surface. The graphene oxides grant a good electronic transference and act like catalysts for the determination of the AC, but the electrode preparation is difficult, expensive and complex. However, it is known that platinised platinum is a unique electrode material in its stability and variety of achievable characteristics. The properties of electrolytic deposits of platinum on platinum and carbon substrates depend on the deposition conditions [19–21]. In addition, platinum nanoparticles (PtNPs) increase the surface area and provide an electron transfer with strong catalytic properties [21, 22]. In fact, some years ago, we prepared very efficient and sensitive new sensors by using PtNPs under several polymer films [23, 24].

Ferrocene and its derivatives have been widely used as electron transfer mediators, catalysts or electrochemical probes. Highly sensitive detection of L-glutamate [25], glucose [26], cancer biomarker and cocaine [27, 28], isoproterenol, acetaminophen, theophylline [29] and others [30, 31] has been performed on ferrocene derivatives modified electrodes. Ferrocene derivatives have been also used for the simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen [32] and as bioelectrocatalysts in oxidase, peroxidase [33–36] and dehydrogenase biosensors [37].

However, ferrocene can easily diffuse away from the electrode surface, and it is vitally important to link the mediator with high molecular weight compounds, polymers or NPs. From quite a few years, we have investigated redox-active organometallic silicon and nitrogen-based dendritic and polymeric materials containing ferrocenyl and permethylferrocenyl groups [37–43]. Dendrimers are well-defined highly branched macromolecules that emanate from a central core and are formed by iterative reaction sequences, each one of this iterative reaction accounting for a new “generation”. Dendrimers can be deposited on electrode surfaces by forming layers which have high mechanical stability. Their highly branched structure and their large area make them useful materials for sensor fabrication. Dendritic macromolecules containing a controlled number of redox-active organometallic units at the core, within the branches or at the periphery of the dendritic structure, are good candidates as catalyst systems.

Our previous experiences [23, 24] led us to think that the incorporation of PtNPs under the dendrimer films would allow developing new sensors more efficient and sensitive because of their increased effective surface and the catalytic synergic effect with the interacting ferrocenes. We use in this work poly(propyleneimine) dendrimers of three generations.

Experimental

Reagents and solutions

In this work, we have used three poly(propyleneimine) dendrimers DAB-1-(NHCOFc)₄ (Dend1st), DAB-3-(NHCOFc)₁₆ (Dend3rd) and DAB-5-(NHCOFc)₆₄ (Dend5th) synthesized as previously described [44] (Fig 1). Acetaminophen, glucose, uric acid, ascorbic acid and the solvents were purchased from Sigma. All other chemicals were analytical grade and were used without further purification. The 2 mM K₂PtCl₆·H₂O (≥ 99.9 % from Aldrich) solution was prepared in 0.5 M H₂SO₄. Ultrapure water was used for preparation of buffers and standards, and for electrochemistry solutions. The electrolyte bath for the polymer deposition contained 10⁻⁴ M in the redox-active species (ferrocene) and 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate in dichloromethane. All other amperometric measurements were performed in 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 with 0.1 M NaClO₄ as supporting electrolyte. The solutions were deoxygenated by bubbling high-purity nitrogen for at least 15 min.

Apparatus

All electrochemical measurements were performed using an Ecochemie BV Autolab PGSTAT 12. The experiments were carried out in a conventional three-electrode cell at 20–21 °C with a Pt disc of 3 mm diameter as working electrode and a Pt wire as auxiliary electrode. A BAS non-aqueous Ag/Ag⁺ reference electrode and a saturated Calomel reference electrode (SCE) were employed in organic solvents and aqueous media, respectively. In steady-state measurements, an Autolab rotating-disc electrode was used.

Preparation of dendrimer and dendrimer/PtNPs modified Pt electrodes

Prior to coating, Pt disc electrodes were polished using 0.1 μm alumina powder and rinsed in ultrapure water in an ultrasonic bath. Each electrode surface was then conditioned by cycling the potential in 0.5 M H₂SO₄. Finally, the electrodes were rinsed successively with water and acetone and allowed to dry at room temperature. The Pt nanoparticles were prepared by cycling the Pt electrode in the potassium hexachloroplatinate (IV) solution in the scanning potential range from -0.25 to 0.6 V (vs. SCE) at a scan rate of 50 mV s⁻¹ for 20 cycles [21]. The PtNPs/Pt electrodes were rinsed with phosphate buffer and acetone prior to polymer electrodeposition. The electrochemical active surface area (effective area) of new PtNPs/Pt electrodes was measured from the integrated charge of the hydrogen desorption peaks, assuming a charge of 210 μC per cm² of polycrystalline Pt [22, 45]. Figure 2 shows the SEM micrograph of a platinum wire electrode modified

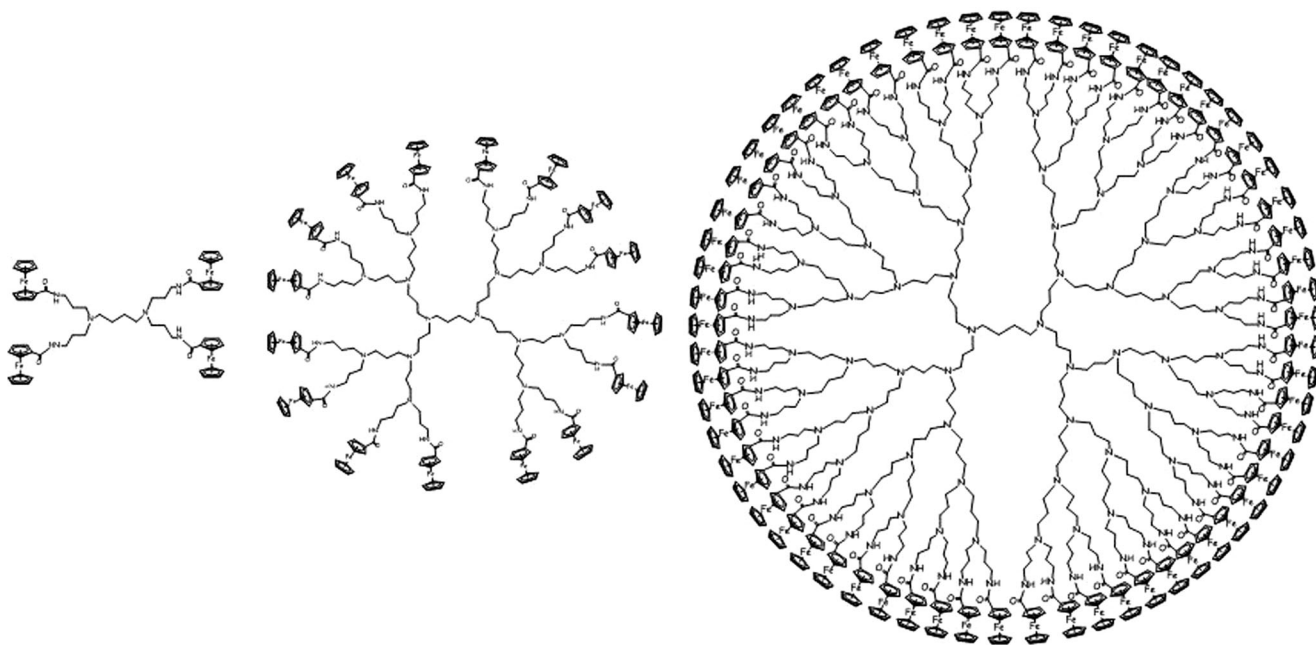


Fig. 1 Ferrocenyl dendrimers of first, third and fifth generation

with electrodeposited PtNPs. As it can be seen, the average size of the PtNPs is about 90 nm.

The dendrimer films were electrodeposited onto Pt or PtNPs/Pt electrodes respectively under potentiostatic control at +1.0 V (vs. Ag/Ag⁺). The coated electrodes were rinsed with dichloromethane and water. In all cases, the surface (or effective surface) coverage of electroactive ferrocenyl sites in the films was determined from the integrated charge of the cyclic voltammetric waves. The dendrimer modified electrodes were stored at room temperature when not in use.

Preparation of real samples

Three kinds of commercial pharmaceutical samples containing acetaminophen were used to evaluate the performance of the sensor, Gelocatil (GELOS S.L. Laboratories, Esplugues de

Llobregat, Barcelona, Spain), Dolocatil (Ferrer Internacional S.A., Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain) and Efferalgan Vitamin C (BRISTOL MYERS SQUIBB Agen-Lot et Garonne, France). For the samples preparation, an accurately weighed portion of finely powered sample, obtained from three tablets, was dissolved in 10 mL of ultrapure water with ultrasonication. Then, 20 μ L of the corresponding solution was added to 10 mL of the 0.01 M phosphate buffer (pH 7)/0.1 M NaClO₄ supporting electrolyte for the analysis with standard addition method.

Results and discussion

Morphological characterization of dendrimer/Pt and dendrimer/PtNPs/Pt electrodes

The morphology of electrodes modified with the three generation dendrimers was studied by scanning electronic microscopy (SEM). Figure 3 shows the surfaces obtained for the two kinds of modified electrodes with the three generation dendrimers.

As it can be seen, all the films of dendrimers form compact deposits which appear to be smoother, more homogeneous and denser with the increasing generation of dendrimer. This fact is also observed in the dendrimer/PtNPs wires, in which dendrimers of increasing generation cover more uniformly the electrochemically deposited PtNPs, Dend5th forming a homogeneous film on the PtNPs in close contact with a highly increased surface.

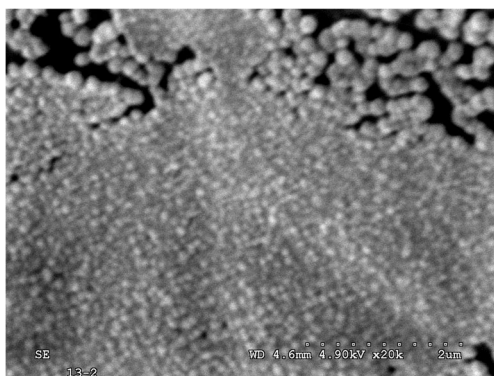


Fig. 2 SEM micrograph of a platinum wire electrode modified with electrodeposited PtNPs

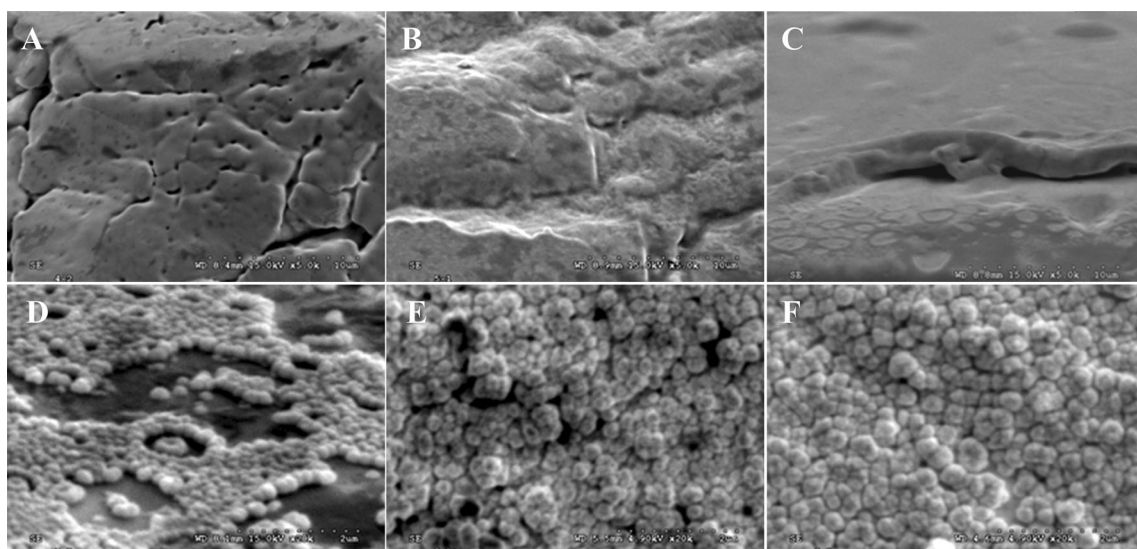


Fig. 3 SEM micrographs of platinum wire electrodes modified with Dend1st, Dend3rd and Dend5th (a, b and c respectively) and PtNPs/Dend1st, PtNPs/Dend3rd and PtNPs/Dend5th (d, e and f, respectively)

Electrochemical and kinetic characterization of dendrimer/Pt and dendrimer/PtNPs/Pt electrodes

Figure 4 shows the cyclic voltammograms of electrodes modified with dendrimers of three generations, together with the same dendrimers deposited onto PtNPs modified electrodes in phosphate buffer 0.01 M (pH 7.0)/NaClO₄ (0.1 M). The first point to be considered is the great increase of the peaks in the

dendrimer/PtNPs electrodes in comparison with the dendrimer electrodes. This fact is unquestionably due to the increase of the effective electrode surface of PtNPs electrodes, but it is important to note the good contact of the ferrocenes with the NPs and between themselves.

On the other hand, the peak intensities increase with the increasing film thickness, indicating the availability of electrons to reach the last layers. In some cases, no increase of the

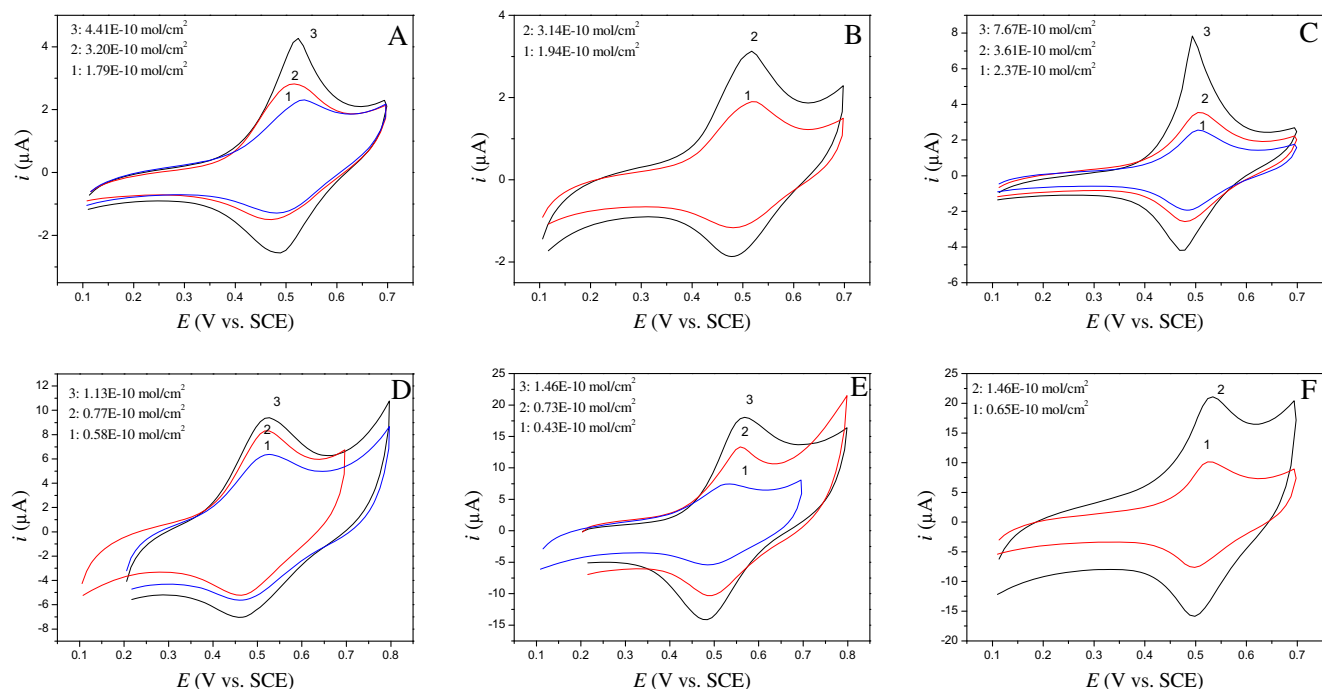


Fig. 4 Dependence of the peak current on the thickness of films for electrodes modified with Dend1st, Dend3rd and Dend5th (a, b and c respectively) and PtNPs/Dend1st, PtNPs/Dend3rd and PtNPs/Dend5th (d, e and f, respectively) in phosphate buffer 0.01 M (pH 7.0)/NaClO₄ (0.1 M); scan rate 100 mV s⁻¹

intensity is observed after E_p with the increasing coverage, indicating the absence of any retardation in the electronic transference [46]. However, the majority of cases show a certain increase of intensity after the peak due to the natural increase of the path of electrons. In all cases, we can observe the diffusion tail related with multilayer films.

The cyclic voltammograms of modified electrodes at several scan rates present in all cases cathodic and anodic peaks separations (ΔE_p) practically constant but higher than zero (see Table 1), indicative of the absence of kinetic limitations [47]. The ΔE_p values of the dendrimer electrodes are close to a reversible system in homogeneous media ($0.058/n$) and rather higher for the dendrimer/PtNPs electrodes probably due to their non-planar heterogeneous surface.

The ferrocene oxidation into ferricinium moieties needs charge balance, and therefore, the diffusion of the counter ions to the oxidized organometallic groups will contribute to the electrochemical reaction kinetics, influencing the voltammetric response. Plots of the anodic and cathodic peak currents vs. the scan rate (not shown) show a linear relationship for sweep rates above 0.2 V/s, indicating the surface confined nature of the electroactive groups as theoretically predicted for a surface-immobilized couple. However, the anodic peak currents show a linear relationship with v^x (Fig. 5), taking x values between those found by Laviron [46] for multilayer films of reversible systems with fast electron transfer ($x = 0.6$) and the unit (indicative of nonexistence of charge percolation in a monolayer film). In addition, a dependence of charge on the scan rate is observed in the cyclic voltammograms: Q increases as v decreases, which confirms the multilayer structure of dendrimer film and the existence of certain charge percolation [48]. These data are in agreement with the bibliography [49] and indicate fast kinetics with electronic transfer with the electrode also fast [45]. In all cases, the electron transport step within the film limits the overall rate resembling the diffusion of electroactive

species in homogenous media, [48] according to an electron hopping quasi-diffusional model.

A very successful approach for the interpretation of this problem is based on the fact that the speed of electrons and the corresponding balancing counter ions transport through the multilayer films obeys the diffusion laws, with a called diffusion coefficient of charge transport, apparent, or effective diffusion coefficient. Some cases have been reported in which a change in the linear dependency of i_p from v to $v^{1/2}$ is observed, due to the interaction between the scan rate and the charge transfer kinetics through the film [49]. When the current of the voltammetric peak is proportional to $v^{1/2}$, it can be expressed by the same equation used for species in solution:

$$I_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_{ct}^{1/2} C_0 v^{1/2}$$

Where D_{ct} is the apparent diffusion coefficient and C_0 is the concentration (mol cm^{-3}) of active sites in the film. In our case, the i_p show a linear behaviour vs. $v^{1/2}$ at scan rates higher than 1.0 V s^{-1} and D_{ct} can be obtained from the slopes of the $i_p - v^{1/2}$ plots. The concentration of active sites in the film, C_0 , is calculated from the integrated area below the voltammetric peak and the depth of the dendrimer coverage obtained by AFM measurements.

Figure 6 shows the selected AFM images of ITOs modified with the three generation dendrimer films and the respective depth distributions. Unfortunately, the AFM does not provide topographic information of dendrimer multilayer films because the matter sticks to the cantilever tip and distorts the film surface. However, this technique was useful to obtain the thickness of films in order to calculate the concentration of active sites in the film, C_0 . The obtained values for Dend1st, Dend3rd and Dend5th films were $2.84 \cdot 10^{-4}$, $2.62 \cdot 10^{-4}$ and $7.20 \cdot 10^{-4} \text{ mol Fc cm}^{-3}$ respectively, indicating that the Dend5th films are the densest and the Dend1st and Dend3rd films are very similar. Table 1 shows the D_{ct} average values

Table 1 Electrochemical and kinetic results

Electrode	^a E° (V vs. SCE)	^a ΔE_p (V)	^a $W_{1/2}$ at 2 V s ⁻¹ (mV)	D_{ct} ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) ($I^{\circ} \cong 1.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)
Dend1 st	0.517	0.061 ± 0.008	130	$2.1 \cdot 10^{-11}$
Dend3 rd	0.511	0.053 ± 0.007	110	$1.8 \cdot 10^{-11}$
Dend5 th	0.503	0.057 ± 0.014	101	$0.5 \cdot 10^{-11}$
Dend1 st /PtNPs	0.513	0.089 ± 0.010	120	$5.5 \cdot 10^{-11}$
Dend3 rd /PtNPs	0.522	0.084 ± 0.013	100	$5.2 \cdot 10^{-11}$
Dend5 th /PtNPs	0.526	0.068 ± 0.016	80	$5.8 \cdot 10^{-11}$

^a Average of six electrodes

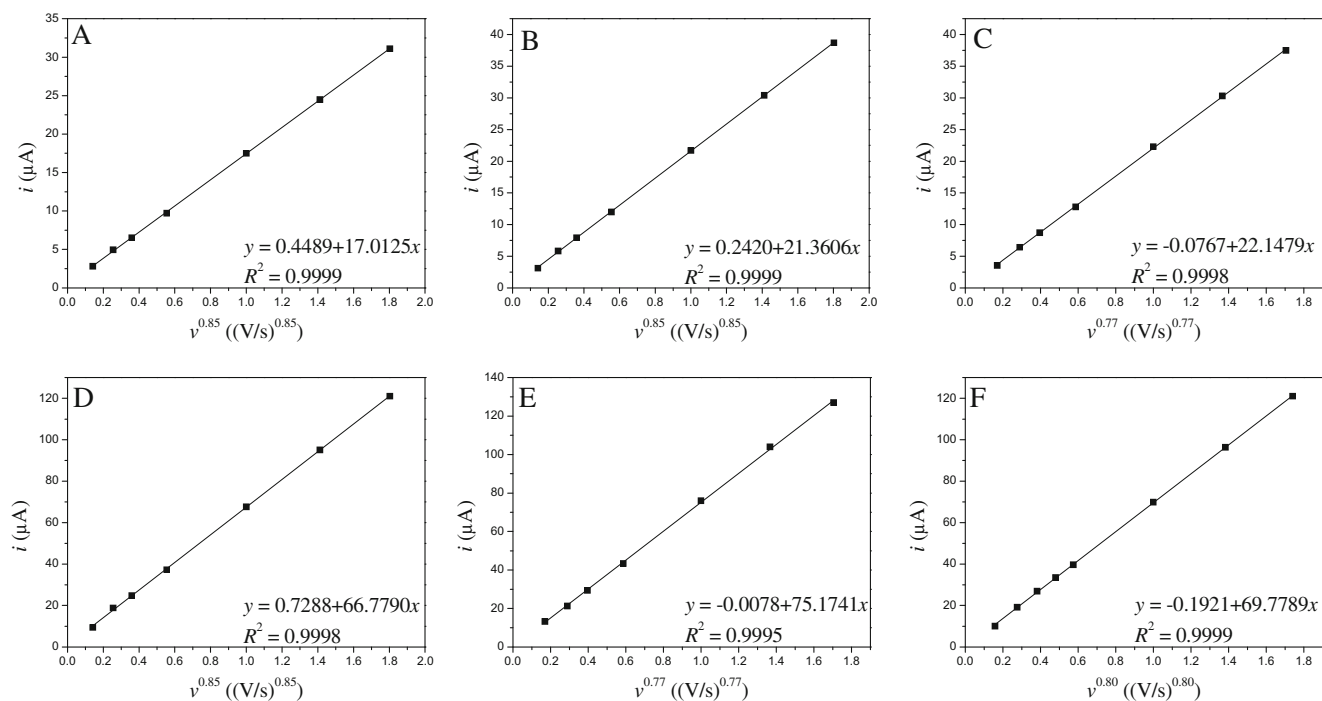


Fig. 5 Dependence of i_p on v^x for electrodes modified with Dend1st, Dend3rd and Dend5th (A, B and C respectively) and PtNPs/Dend1st, PtNPs/Dend3rd and PtNPs/Dend5th (D, E and F respectively)

for each one of the six modified electrodes. These results are in good agreement with the literature [50].

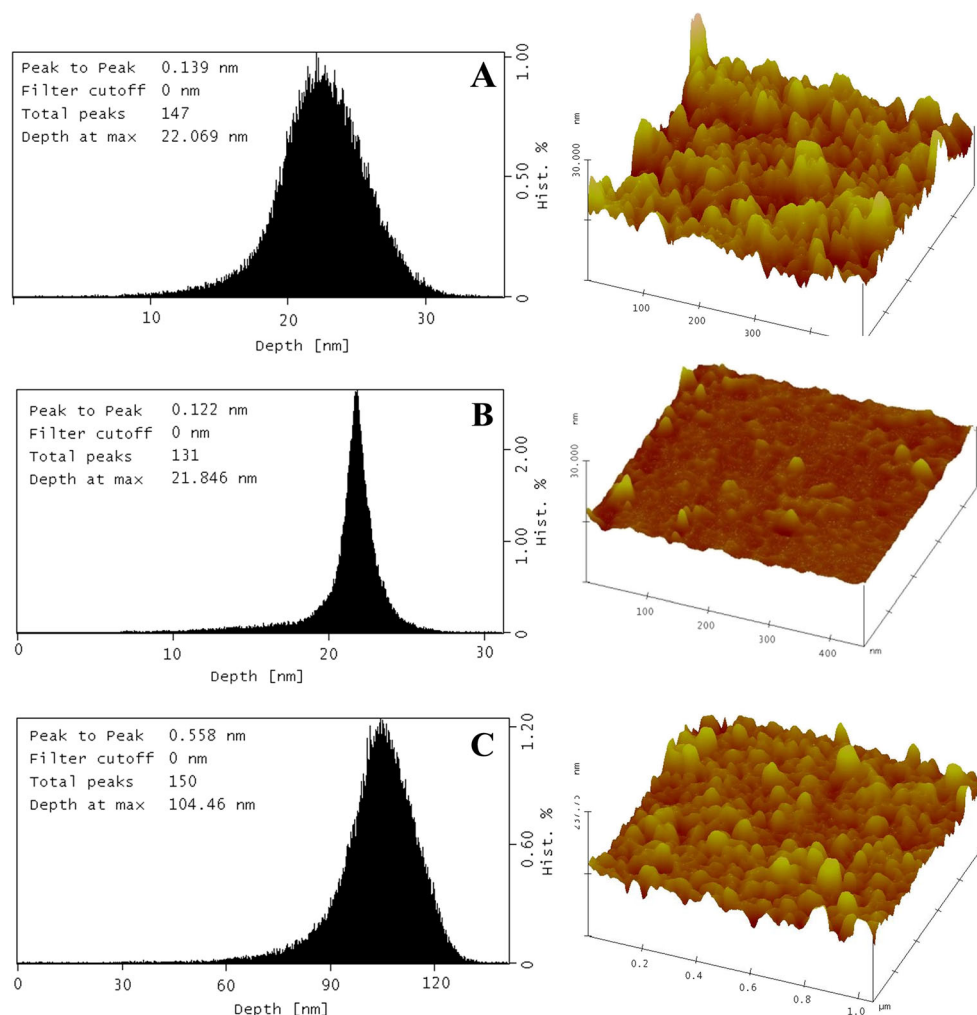
The electronic transfer coefficients α were estimated from the width at mid-height $W_{1/2}$. For very high scan rates, the $W_{1/2}$ of the cathodic peak is equal to $62.5/\alpha$ mV and for the anodic peak to $62.5/(1 - \alpha)$ when only one electron is transferred [51]. The $W_{1/2}$ values obtained (see Table 1) for the anodic and cathodic peaks were equal, indicating that $\alpha = 0.5$ in all cases, but slightly different than the theoretical Nernst value ($90.6/n$). This distortion in relation to the Nernstian value (flatter peaks) occurs because the electrochemical reaction in the first layer, which controls the reaction in the bulk of the coating, becomes more spread out along the potential axis [52]. The broadening has been attributed to repulsive interactions, to differences in the spatial distribution of the redox centres, the different E° values for the electroactive groups or to the influence of the inhomogeneity of the electrode surface. The narrowing is related to attractive interactions, and it occurs only in the Dend5th/PtNPs modified electrodes. From Table 1, we can observe that these interactions diminish with the increasing generation of dendrimer and in the dendrimer/PtNPs modified electrodes compared to the dendrimer electrodes. In addition, the inclusion of PtNPs besides offering a greater area of contact increases the apparent diffusion coefficient D_{ct} improving the electron transfer. To that effect, the fifth generation dendrimer showed the best result.

Electrooxidation of acetaminophen at the dendrimer/Pt and dendrimer/PtNPs/Pt electrodes

The acetaminophen electrochemical oxidation involves two electrons and two protons to generate N-acetyl-p-quinoneimine [53, 54], and its oxidation potential is pH-dependent (Scheme 1). The effect of pH on the electrochemical response of the modified electrodes toward acetaminophen oxidation was studied in the pH range from 4 to 9, and the obtained results are in similar to those reported by other authors [15, 55, 56]. The anodic peak potentials are observed to shift to more negative potentials with an increase of the solution pH, indicating that the electrocatalytic oxidation of acetaminophen is pH-dependent, and the electrode reaction was accompanied by the transfer of protons. In addition, the anodic peak current of acetaminophen increases up to pH 7, and at higher pH values, the peak current starts to decrease. Consequently, a pH value of 7.0 was chosen as optimum for all the experiments. At pH 7.0, AC shows electrochemically irreversible redox behaviour with oxidative and reduction peaks at 0.480 and 0.018 V vs. Ag/AgCl, respectively, at the bare GC electrode [2]. However, the electrochemical behaviour of AC at a Pt bare electrode is not described because the oxidation peak occurs at more positive potentials overlapping with the platinum profile and it is useless.

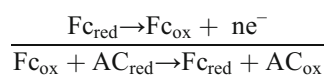
Figure 7 shows the cyclic voltammetric response for the electrochemical oxidation of 0.3 mM acetaminophen

Fig. 6 3D AFM images of ITOs modified with Dend1st, Dend3rd and Dend5th ($\Gamma = 3.20 \cdot 10^{-10}$; $3.14 \cdot 10^{-10}$ and $3.61 \cdot 10^{-10}$ mol Fc/cm respectively) and depth distributions (left)



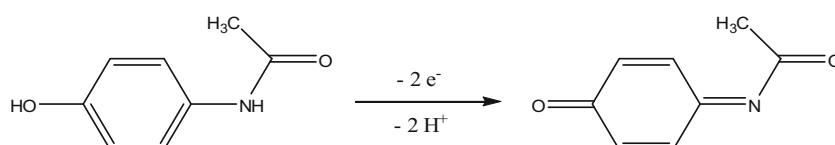
on a Dend5th modified electrode in 0.01 M PBS buffer (pH 7.0)/NaClO₄ 0.1 M electrolyte as an example in comparison with the signal at the Pt bare electrode. As can be seen, at Pt bare electrodes, the AC oxidation occurs at much more positive potentials than at modified electrodes, which indicates an appreciable catalytic effect of the dendrimer/PtNPs film. The addition of acetaminophen leads to a substantial enhancement of the oxidation current, whereas the ferrocene cathodic peak disappears, as expected for a catalytic process. Acetaminophen exhibited an irreversible electrochemical behaviour with an oxidation peak at $E_{pa} = 0.48$ V vs. SCE. Notice that catalytic currents flow at potentials at which ferrocene units are oxidized, indicating that

ferrocene acts as mediator of a mediated reaction sequence which can be described by the simplified scheme:



The electron transfer occurs between the electrode and ferrocene and not directly between the electrode and the analyte, and the active form of the catalyst is electrochemically regenerated. The net results of this electron shuttling are a decrease of the overvoltage to the potential of the ferrocene and an increase in current density [57].

Scheme 1 Reaction of electrooxidation of acetaminophen



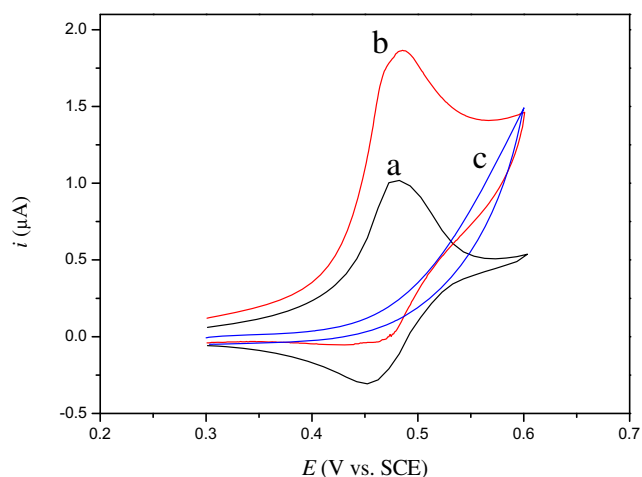


Fig. 7 Cyclic voltammograms of a Dend5th ($\Gamma = 2.343 \cdot 10^{-10}$ molFc/cm² thickness film) modified electrode in absence (a) and presence (b) of acetaminophen 0.3 mM in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) and NaClO₄ 0.1 M as supporting electrolyte. c Cyclic voltammogram of a Pt bare in presence of AC 0.3 mM in the same supporting electrolyte, Scan rate 10 mV/s

The kinetics of the electrocatalytic reaction was studied by rotating-disc voltammetry. The linearity of the Levich plots (i vs. $\omega^{1/2}$) [58] obtained in N₂-saturated solutions of acetaminophen at low rotation rates indicates mass-transport limited kinetics. At higher rotation rates, these plots deviate from linearity suggesting a kinetic limitation. That is, Levich plots indicate that the limiting currents for the oxidation of acetaminophen at modified electrodes are not entirely transport controlled but are also partially controlled by the catalysed electron-transfer kinetics. Under these conditions, the Koutecky–Levich equation [59, 60] can be used to determine the rate constant and the diffusion coefficients, D_0 , of the AC oxidation at the modified electrodes:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{n F A C^0} \left(\frac{1}{k_{\text{obs}} \Gamma} - \frac{1}{0.620 D_0^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}} \right)$$

Where n denotes the number of electrons, F the Faraday constant, A the electrode area, ν the kinematic viscosity, D_0 the diffusion coefficient, Γ is the coverage (the sum of both the oxidized and reduced form of the bound mediator at any potential), ω the angular velocity, k_{obs} is the heterogeneous second-order rate constant and C^0 the bulk concentration of AC.

The diffusion coefficient, D_0 , can be evaluated from the slope of the Koutecky–Levich plots (i^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$), knowing the number of electrons participating in the reaction ($n = 2$ in this case). The heterogeneous rate constant, k_{obs} , can also be evaluated from the intercept, once the Γ value is known by integrating the area under the CV waves. The rate constants and the

acetaminophen diffusion coefficients obtained from the Koutecky–Levich plots (i^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$) are summarized in Table 2. From these results, we can observe that electrodes modified with 5th generation dendrimer and PtNPs are more efficient than the others; consequently, the Dend5th/PtNPs modified electrode was chosen to develop the new AC sensor. The diffusion coefficients obtained for acetaminophen are higher than those in aqueous solution [61], confirming that the overall reaction rate is not diffusion-controlled and indicating that the electrochemical catalytic reaction occurs practically in the surface of Dend5th/PtNPs modified electrode, which oxidizes AC very efficiently. The lower D_0 values obtained with the PtNPs modified electrodes must be due to inhomogeneity of the electrode surface, but in view of the rate constant values, it does not affect the efficiency of dendrimer/PtNPs electrodes.

Analytical characterization of sensor

Once the more efficient modified electrode and working pH value were selected, the analytical characterization of the sensor was carried out by amperometric measurements. Figure 8a shows the amperometric responses (first part of calibration curves) of the Dend5th/PtNPs electrode, to successive additions of aliquots of acetaminophen, at several applied potentials vs. SCE. As it can be seen, the amperometric signal improves with the increasing potential from 0.4 to 0.5 V vs. SCE, but the improvement is not significant when the potential increases above 0.5 V. Consequently, the working potential of 0.5 V was chosen as optimum. Figure 8b shows the complete calibration plot of a Dend5th/PtNPs electrode at 0.5 V working potential. In all cases, the anodic current reached a steady state within 5 s. The inset in Fig. 8b shows the amperometric response at 0.5 V.

All the curves obtained at the several applied potential values consist of several linear ranges. The mean results for five electrodes at the several applied potentials are summarized in Table 3.

Table 2 Kinetic results of AC electrooxidation

Electrode	^a Γ (mol Fc cm ⁻²)	^a k_{obs} (M ⁻¹ s ⁻¹)	D_0 (cm ² s ⁻¹)
Dend1 st	$5.6 \cdot 10^{-10}$	$2.8 \cdot 10^3$	$2.2 \cdot 10^{-5}$
Dend3 rd	$4.9 \cdot 10^{-10}$	$2.0 \cdot 10^3$	$3.2 \cdot 10^{-5}$
Dend5 th	$4.1 \cdot 10^{-10}$	$1.7 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^{-5}$
Dend1 st /PtNPs	$0.7 \cdot 10^{-10}$	$4.0 \cdot 10^3$	$6.8 \cdot 10^{-7}$
Dend3 rd /PtNPs	$0.9 \cdot 10^{-10}$	$5.5 \cdot 10^3$	$9.8 \cdot 10^{-7}$
Dend5 th /PtNPs	$0.9 \cdot 10^{-10}$	$5.6 \cdot 10^3$	$7.1 \cdot 10^{-7}$

^a Average of five electrodes

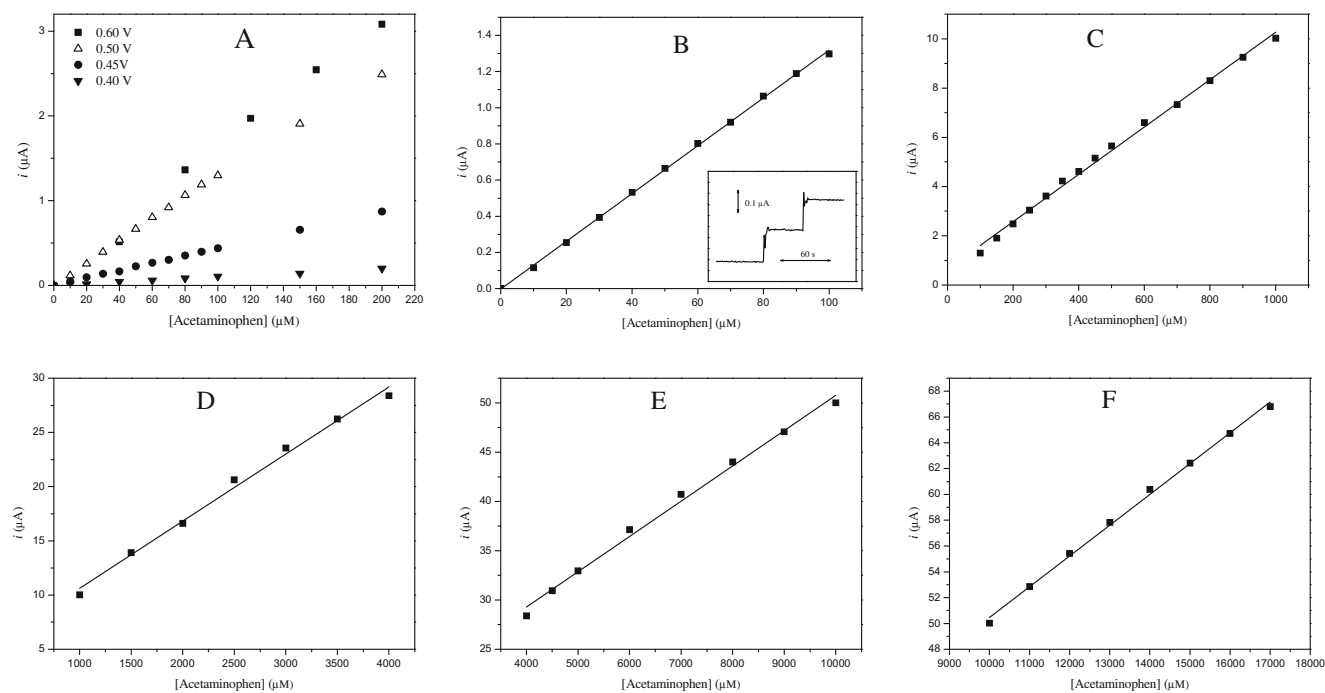


Fig. 8 Plots of chronoamperometric currents vs. acetaminophen concentration of a rotating Dend5th/PtNPs electrode ($\Gamma = 1.995 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm⁻²), at several measuring potentials (**a**), and calibration plots for all the linear ranges (**b, c, d, e** and **f**) of the same

electrode at 0.5 V vs. SCE, in deaerated 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)/NaClO₄ 0.1 mol L⁻¹ solution and rotation speed of 500 rpm. The inset in **b** is the corresponding amperometric responses of the same electrode to two successive additions of 10 μM acetaminophen

One of the highlights of this work is that the responses displayed linear concentration ranges much wider than those published in the literature, all of them with good correlation coefficients and good detection limits, with acceptable sensitivities, taking into account the simplicity of this device in comparison with other proposed acetaminophen electrochemical sensors (Table 4).

In addition, the amperometric response was highly stable in all the experiments. The stability of the modified electrodes was examined by performing successive amperometric measurements at pH 7.0. If the electrodes had been stored, they were pretreated with five potential cycles between 0.1 and -0.7 V (vs. SCE), in phosphate buffer (pH 7.0)/NaClO₄ 0.1 M solution, at 100 mV s⁻¹ prior to use. In this way, the sensor keeps 95 % of the initial response after one month.

Table 3 Analytical results

<i>E</i> (V vs. SCE)	Linear ranges (μM)	Equation (μA vs. μM)	<i>R</i> ²	Detection limit (μM)
0.40	0–3550	$y = (0.001 \pm 0.002)x + (0.005 \pm 0.001)$	0.9991	3.45
	3550–17,550	$y = (7.0 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4})x + (1.22 \pm 0.02)$	0.9983	
0.45	0–700	$y = (0.004 \pm 0.001)x + (0.029 \pm 0.003)$	0.9992	0.27
	700–3500	$y = (0.003 \pm 0.002)x + (0.742 \pm 0.001)$	0.9985	
	3500–14,000	$y = (8.0 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-4})x + (1.775 \pm 0.002)$	0.9973	
0.50	0–100	$y = (0.013 \pm 0.001)x - (0.003 \pm 0.002)$	0.9994	0.24
	100–1000	$y = (0.010 \pm 0.002)x + (0.645 \pm 0.004)$	0.9962	
	1000–4000	$y = (0.006 \pm 0.002)x + (4.433 \pm 0.003)$	0.9929	
	4000–10,000	$y = (0.004 \pm 0.002)x + (14.949 \pm 0.01)$	0.9942	
0.6	10,000 – —	$y = (0.002 \pm 0.003)x + (26.6 \pm 0.007)$	0.9977	
	0–200	$y = (0.016 \pm 0.003)x + (7 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-4})$	0.9949	

Table 4 Comparison with reported electrochemical sensors acetaminophen

Electrode	Linear range (μM)	LOD (μM)	Ref.
PLS modified GC	1–10	0.1	[2]
AuNP-PGA/SWCNT	8.3–145.6	1.18	[18]
Nafion/ER-GO/GC	0.4–1.0 1.0–10	0.025	[62]
PolyDAN-RB4/GC	0.2–164	0.083	[56]
f-MWCNT/GC	0.074–230	0.040	[15]
Bare GC	38.1–160	0.2	[15]
AuNPs/MWCNT/GC	0.09–35	0.03	[14]
Ppyox/AZ/Au	0.2–100	0.08	[63]
IMWCNT-GCE	136.4–500	Not studied	[64]
1,4-BBFT/IL/GPE	10–1000	8.1	[28]
ERG/ Ni_2O_3 -NiO/GCE	0.04–100	0.02	[65]
Pd/GO	0.005–0.5 0.5–80	0.002	[16]
PEDOT/GO	10–60	0.57	[66]
poly(DA)/GC	0.02–500	0.007	[67]
ERGO/ ZrO_2	9–237	Not studied	[17]
AuNPs-DNS/MWCNT/GCE	0.8–400	0.05	[12]
5AEBNPE	0.2–500	0.1	[68]
$\text{Ni}_{0.1}\text{Co}_{0.9}\text{Fe}_2\text{O}_4$ -GC	2–8000	0.011	[1]
Pd/Al	290–3300	Not studied	[69]
4-ABA/GCE	24–240	Not studied	[70]
CHNM-GC	100–10,000	1.83	[71]
OMCs/GCE	0.2–15	0.07	[72]
4-PD-GCE	2–1490	1.56	[73]
ERGO-GCE	0.01–10	0.003	[74]
$\text{LaNi}_{0.5}\text{Ti}_{0.5}\text{O}_3/\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{GC}$	0.5–901	0.19	[75]

Interference study

The coexisting electroactive species which often cause interference with the acetaminophen signal, such ascorbic acid, glucose, dopamine or urea, were investigated by chronoamperometric measurements at an applied potential of 0.5 V vs. SCE. At this potential, dopamine, uric acid and glucose do not interfere even at a 500-fold concentration of acetaminophen (8 μM). Unfortunately, ascorbic acid has a similar oxidation potential and interferes the acetaminophen determination although its signal is 20 % of the AC one.

In order to apply this sensor to the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations, which often contain ascorbic acid (AA), the resolution of AC and AA signals was studied by differential pulse voltammetry (DPV). In these studies, it is necessary to measure the base line because the AC

signal is superposed to the ferrocene oxidation (see Fig. 6), and it must be subtracted. Figure 9 shows the AC and AA peaks sufficiently separated to allow the AC determination. As the AC concentration increases, the AA peak decreases, and from 150 μM AC for an AA concentration of 500 μM , the peak disappears and AA does not interfere with the AC measurement. This phenomenon could be related with the fact that AC oxidation occurs in the surface of modified electrode (see discussion above), and from a certain AC concentration, it is possible that the AC molecules block the access to AA ones because of their faster electrochemical reaction on the modified electrode.

Real samples analysis

The developed sensor was applied to the analysis of three different commercial acetaminophen pharmaceutical samples (Gelocatil, Dolocatil and Efferalgan Vitamin C) by DPV. The tablets were weighed, ground into power and dissolved in water as earlier described. The AC concentration was determined by the standard addition method and the results are shown in Table 5. The results are the average values of five replicate measurements with different electrodes. The reference values are those given by the tablets specifications. As it can be seen from Table 5, the recovery for the determination of AC in absence (Gelocatil and Dolocatil) and presence of AA (Efferalgan Vitamin C) was very good, demonstrating the efficiency of the developed sensor for the accurate and reproducible determination of acetaminophen.

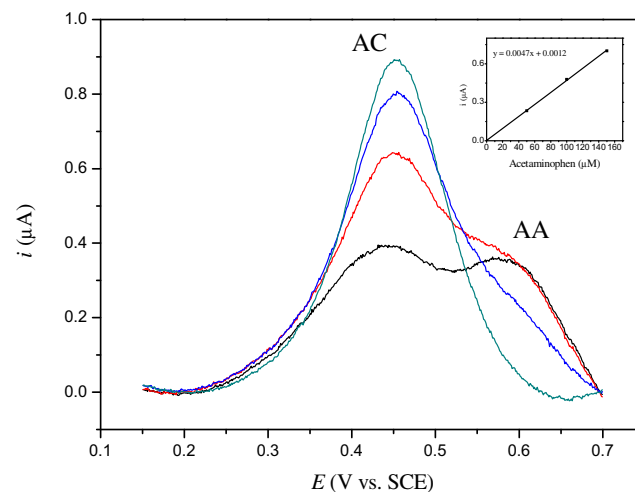


Fig. 9 DPV responses at Dend5th/PtNPs modified electrode for varying concentrations of AC (0, 50, 100 and 150 μM) in the presence of 500 μM AA in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) and NaClO_4 0.1 M at a scan rate of 5 mVs^{-1} . Inset: Calibration plot with $R^2 = 0.9996$

Table 5 Acetaminophen determination in pharmaceutical samples

Sample	Content (mg/tablet)	Added (μM)	Electrode	Found (μM)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Gelocatil	AC 1000	127.83	1	126.56	99.01	1.9
			2	129.25	101.11	2.0
			3	127.92	100.07	1.5
			4	127.36	99.63	1.3
			5	128.00	100.13	1.9
Dolocatil	AC 1000	132.75	1	133.57	100.62	2.0
			2	133.87	100.84	1.5
Efferalgan Vitamin C	AC 330, AA 200	151.23	1	155.27	102.67	1.6
			2	152.00	100.51	1.5
			3	152.33	100.73	1.8

Conclusion

New amperometric sensors based on electrodes modified with poly(amidoamine) ferrocene dendrimers of three generations have been studied. The modified electrodes were characterized by SEM, AFM and electrochemical methods. The kinetic study of modified electrodes with and without PtNPs demonstrates that the electrodes do not have kinetic limitations. Besides, the electrodes which contain PtNPs improve the electron transfer and increase the active surface. The developed electrodes showed excellent electrocatalytic behaviour toward the acetaminophen oxidation which exhibited an irreversible electrochemical behaviour with an oxidation peak at $E_{pa} = 0.48$ V vs. SCE. The kinetics of electrocatalytic AC oxidation was studied by rotating-disc voltammetry demonstrating that electrodes modified with the Dend5th and PtNPs are the most efficient. The obtained acetaminophen diffusion coefficients values are higher than in aqueous solution, indicating that the overall reaction rate is not diffusion-controlled and that the electrochemical catalytic reaction occurs practically in the surface of modified electrodes. The Dend5th/PtNPs sensor shows a linear relationship between the concentration and current response at 0.5 V vs. SCE in a wider range than all the acetaminophen sensors reported in literature, to the authors' knowledge, and consequently, it can be used in samples of several AC concentrations without dilution. The detection limit was 0.24 μM at 0.5 V. In addition, the Dend5th/PtNPs sensor exhibited stable and reproducible responses without interference from glucose, dopamine or urea. By DPV, a well separation between the oxidation peaks of AA and AC is obtained, allowing the AC determination. The AA peak is influenced by the presence of AC, probably because the AC oxidation is favoured, and the access of AA to the electrode

surface is blocked by the AC molecules from certain concentration consequently, the simultaneous determination is not possible. The Dend5th/PtNPs sensor was successfully used for the determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations.

Acknowledgments The authors thank the Spanish Dirección General de Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Project No. CTQ-2009-12321-C02) for financial support of this research. C. Villena acknowledges the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral fellowship (BES-2010-028705).

References

- Kumary A, Jayan D, Nancy TEM (2014) Ni_{0.1}Co_{0.9}Fe₂O₄-based electrochemical sensor for the detection of paracetamol. *J Solid State Electrochem* 18:2513–2519
- Chen T, Huang K (2012) Electrochemical detection and degradation of acetaminophen in aqueous solutions. *Int J Electrochem Sci* 7:6877–6892
- Gui-Ting L, Hui-Fen C, Guo-Ming L, Ping-ping Y, Xiao-Ping W, Ying-Zhi J, Xiao-Yu G, Ying W, Hai-Feng Y (2014) One-step electrodeposition of graphene loaded nickel oxides nanoparticles for acetaminophen detection. *Biosens Bioelectron* 56:26–32
- Mohamed FA, Abdallah MA, Shammam SM (1997) Selective spectrophotometric determination of p-aminophenol and acetaminophen. *Talanta* 44:61–68
- Bouhsain Z, Garriges S, de la Guardia M (1997) PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations. *Fresenius J Anal Chem* 357:973–976
- Srivastava MK, Ahmed S, Singh D, Shukla IC (1985) Titrimetric determination of dipyrone and paracetamol with potassium hexacyanoferrate(III) in an acidic medium. *Analyst* 110:735–737
- Zhao S, Bai W, Yuan H, Xiao D (2006) Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* 559:195–199

8. Easwaramoorthy D, Yu YC, Huang HJ (2001) Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol-permanganate based reaction. *Anal Chim Acta* 439:95–100
9. Ravinsanka S, Vasudevan M, Gandhimathi M, Suresh D (1998) Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. *Talanta* 46: 1577–1581
10. He FY, Liu AL, Xia XH (2004) Poly(dimethylsiloxane) microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection for rapid measurement of acetaminophen and its hydrolysate. *Anal Bioanal Chem* 379:1062–1067
11. Kunkel A, Gunter S, Watzig H (1997) Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision. *J Chromatogr A* 768:125–133
12. Liu X, Zhang XY, Wang LL, Wang YY (2014) A sensitive electrochemical sensor for paracetamol based on a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes and dopamine nanospheres functionalized with gold nanoparticles. *Microchim Acta* 181:1439–1446
13. Sánchez-Obrero G, Mayén M, Rodríguez Mellado JM, Rodríguez Amaro R (2011) Electrocatalytic oxidation of acetaminophen on a PVC/TTF-TCNQ composite electrode modified by gold nanoparticles: application as an amperometric sensor. *Int J Electrochem Sci* 6:2001–2011
14. Madrakian T, Haghshenas E, Afkhami A (2014) Simultaneous determination of tyrosine, acetaminophen and ascorbic acid using gold nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode by differential pulse voltammetric method. *Sensors Actuators B* 193:451–460
15. Umasankar Y, Unnikrishnan B, Chen S, Ting T (2012) Effective determination of acetaminophen present in pharmaceutical drug using functionalized multi-walled carbon nanotube film. *Int J Electrochem Sci* 7:484–498
16. Li J, Liu J, Tan G, Jiang J, Peng S, Deng M, Qian D, Feng I, Liu Y (2014) High-sensitivity paracetamol sensor based on Pd/graphene oxide nanocomposite as an enhanced electrochemical sensing platform. *Biosens Bioelectron* 54:468–475
17. Vilian ATE, Rajkumar M, Chen S (2014) In situ electrochemical synthesis of highly loaded zirconium nanoparticles decorated reduced graphene oxide for the selective determination of dopamine and paracetamol in presence of ascorbic acid. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 115:295–301
18. Bui MPN, Li CA, Han KN, Pham XH, Seong GH (2012) Determination of acetaminophen by electrochemical co-deposition of glutamic acid and gold nanoparticles. *Sensors Actuators B* 174:288–324
19. Petrii O A, Tsirlina G A, Pron'kin SN, Spiridonov FM, Khrushcheva ML (1999) *Russ J Electrochem* + 35:8–18
20. Yasin HM, Denuault G, Pletcher D (2009) *J Electroanal Chem* 633: 327–332
21. Huang T, Jiang R, Zhang D, Zhuang J, Cai W, Yu A (2010) AC impedance investigation of plating potentials. *J Solid State Electrochem* 14:101–107
22. Bas SZ, Gülce H, Yıldız S (2011) Amperometric xanthine biosensors based on electrodeposition of platinum on polyvinylferrocenium coated Pt electrode. *J Mol Catal B: Enzyme* 72:282–288
23. García Armada MP, Losada J, Zamora M, Alonso B, Cuadrado I, Casado CM (2006) Electrocatalytic properties of polymethylferrocenyl dendrimers and their applications in biosensing. *Bioelectrochemistry* 69:65–73
24. Losada J, García Armada MP (1997) A glucose amperometric sensor based on covalent immobilization of glucose oxidase in poly-2-aminoaniline film via chloranil on platinumized platinum electrode. *Electroanalysis* 9:1406–1411
25. Huang XJ, Im HS, Lee DH, Kim HS, Choi YK (2006) Ferrocene functionalized single-walled carbon nanotube bundles. Hybrid interdigitated construction film for l-glutamate detection. *J Phys Chem* 111:1200–1206
26. Goff AL, Moggia F, Debou N, Jegou P, Artero V, Fontecave M, Joussemme B, Palacin S (2010) Facile and tunable functionalization of carbon nanotube electrodes with ferrocene by covalent coupling and π -stacking interactions and their relevance to glucose bio-sensing. *J Electroanal Chem* 641:57–63
27. Du Y, Chen C, Yin J, Li B, Zhou M, Dong S, Wang E (2011) Solid-state probe based electrochemical aptasensor for cocaine: a potentially convenient, sensitive, repeatable, and integrated sensing platform for drugs. *Anal Chem* 82:1556–1563
28. Wang J, Zhu X, Tu Q, Guo Q, Zarui CS, Momand J, Sun XZ, Zhou F (2008) Capture of p53 by electrodes modified with consensus dna duplexes and amplified voltammetric detection using ferrocene-capped gold nanoparticle/streptavidin conjugates. *Anal Chem* 80: 769–774
29. Tajik S, Taher MA, Beitollahi H (2014) Application of a new ferrocene-derivative modified-graphene paste electrode for simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen and theophylline. *Sensors Actuators B* 197:228–236
30. Beitollahi H, Raof JB, Hosseinzadeh R (2011) Application of a carbon-paste electrode modified with 2,7-bis(ferrocenyl ethyl)fluoren-9-one and carbon nanotubes for voltammetric determination of levodopa in the presence of uric acid and folic acid. *Electroanalysis* 23:1934–1940
31. Raof JB, Ojani R, Beitollahi H, Hosseinzadeh R (2006) Electrocatalytic oxidation and highly selective voltammetric determination of L-cysteine at the surface of a 1-[4-(ferrocenyl ethynyl)phenyl]-1-ethanone modified carbon paste electrode. *Anal Sci* 22:1213–1220
32. Liu M, Chen Q, Lai C, Zhang Y, Deng J, Li H, Yao S (2013) A double signal amplification platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen based on a nanocomposite of ferrocene thiolate stabilized Fe₃O₄@Au nanoparticles with graphene sheet. *Biosens Bioelectron* 48:75–81
33. García Armada MP, Jiménez A, Losada J, Alonso B, Casado CM (2012) New carbosilane polymers with interacting ferrocenes as support and bioelectrocatalysts of oxidases to develop versatile and specific amperometric biodevices. *Appl Biochem Biotechnol* 168:1778–1791
34. Losada J, Zamora M, García Armada P, Cuadrado I, Alonso B, Casado CM (2006) Bienzyme sensors based on novel polymethylferrocenyl dendrimers. *Anal Bioanal Chem* 385: 1209–1217
35. M. García Martínez; B. Alonso; C. M. Casado; J. Losada; M. P. García-Armada (2011) Multioperational oxidase biosensors based on carbosilane dendrimers with interacting ferrocenes *Electroanalysis* 23:2888–2897
36. Jiménez A, García Armada MP, Losada J, Villena C, Alonso B, Casado CM (2014) Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles. *Sensors Actuators B* 190:111–119
37. Takada K, Díaz DJ, Abruña HD, Cuadrado I, Casado CM, Alonso B, Morán M, Losada J (1997) Redox-active ferrocenyl dendrimers: thermodynamics and kinetics of adsorption, in-situ electrochemical quartz crystal microbalance study of the redox process and tapping mode AFM imaging. *J Am Chem Soc* 119:10763–10773
38. Casado CM, Cuadrado I, Morán M, Alonso B, García B, González B, Losada J (1999) Redox-active ferrocenyl dendrimers and polymers in solution and immobilised on electrode surfaces. *Coord Chem Rev* 185–186:53–80
39. Takada K, Díaz DJ, Abruña HD, Cuadrado I, González B, Casado CM, Alonso B, Morán M, Losada J (2001) Cobaltocenium-

- functionalized poly(propylene imine) dendrimers: redox and electrogravimetric studies and AFM imaging. *Chem Eur J* 7: 1109–1117
40. Herrero M, Sevilla R, Casado CM, Losada J, García Armada MP, Rodríguez-Dieguez A, Briones D, Alonso B (2013) Synthesis and electrochemistry of ((diferrocenylsilyl)propyl)- and ((triferrocenylsilyl)propyl)triethoxysilanes. *Organometallics* 31: 5826–5832
 41. Herrero M, Alonso B, Losada J, García Armada MP, Casado CM (2012) Ferrocenyl dendrimers based on octasilsesquioxane cores. *Organometallics* 28:6334–6339
 42. Losada J, García-Armada P, Robles V, Martínez AM, Casado CM, Alonso B (2011) Carbosilane based dendritic cores functionalized with interacting ferrocenyl units: synthesis and electrocatalytic properties. *New J Chem* 34:2187–2195
 43. Herrero M, Losada J, García-Armada MP, Alonso B, Casado CM (2011) Covalently cross-linked ferrocenyl pamamos dendrimer networks. *Aust J Chem* 64:147–152
 44. Cuadrado I, Morán M, Casado CM, Alonso B, Lobete F, García B, Ibisate M, Losada J (1996) Ferrocenyl-functionalized poly(propyleneimine) dendrimers. *Organometallics* 15:5278–5280
 45. Bard AJ, Faulkner LR (2010) *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, New York
 46. Laviron E, Roullier L, Degrand C (1980) A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J Electroanal Chem* 112:11–23
 47. Abruña HD (1991) *Electrochemical Interfaces: modern techniques for in-situ interface characterization*. VCH Pub, Florida, U.S.A.
 48. Lyons MEG (1994) *Electroactive polymer electrochemistry*. Ed Plenum Press, New York
 49. Murray R W (1984) in Bard A J (ed) *Electroanalytical chemistry* vol. 13, Marcel Dekker, New York.
 50. Guadalupe AR, Usifer DA, Potts KT, Hurrell HC, Mogstad AE, Abruña HD (1988) Novel chemical pathways and charge-transport dynamics of electrodes modified with electropolymerized layers of $[\text{Co}(\text{v-terpy})_2]^{2+}$. *J Am Chem Soc* 110:3352–3356
 51. Laviron E (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J Electroanal Chem* 101:19–28
 52. Laviron E (1981) A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: part III. Influence of interactions between the electroactive centers in the first layer on the linear potential sweep voltammograms. *J Electroanal Chem* 122:36–44
 53. Kissinger PT, Roston DA, Van Benschoten JJ, Lewis JY, Heineman WR (1983) Cyclic voltammetry experiment. *J Chem Educ* 60:772–776
 54. Miner DJ, Rice JR, Riggan RM, Kissinger PT (1981) Voltammetry of acetaminophen and its metabolites. *Anal Chem* 53:2258–2263
 55. Duarte EH, Kubota LT, Teixeira Tarley CR (2012) Carbon nanotube based sensor for simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid exploiting multiple response optimization and measures in the presence of surfactant. *Electroanalysis* 24:2291–2301
 56. Chandra P, Son NX, Noh HB, Goyal RN, Shim YB (2013) Investigation on the down regulation of dopamine by acetaminophen administration based on their simultaneous determination in urine. *Biosens Bioelectron* 38:138–144
 57. Wang J (2006) *Analytical electrochemistry*, third edn. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey
 58. Levich VG (1962) *Physicochemical hydrodynamics*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey
 59. Koutecky J, Levich VG (1958) The application of the rotating disc electrode to studies of kinetic and catalytic processes. *Zh Fiz Khim* 32:1565
 60. Munteanu FD, Kubota LT, Gorton L (2001) Effect of pH on the catalytic electrooxidation of NADH using different two-electron mediators immobilised on zirconium phosphate. *J Electroanal Chem* 509:2–10
 61. Ribeiro A, Barros M, Verissimo L, Santos C, Cabral A, Gaspar GD, Esteso MA (2012) Diffusion coefficients of paracetamol in aqueous solutions. *J Chem Thermodynamics* 54:97–99
 62. Filik H, Çetintaş G, Avan AA, Koç SN, Boz I (2013) Electrochemical sensing of acetaminophen on electrochemically reduced graphene oxide-nafion composite film modified electrode. *Int J Electrochem Sci* 8:5724–5736
 63. Gholivand MB, Amiri M (2012) Simultaneous detection of dopamine and acetaminophen by modified gold electrode with polypyrrole/azophloxine film. *J Electroanal Chem* 676:53–59
 64. Nasirizadeh N, Shekari Z, Zare HR, Shishehbore MR, Fakhari AR, Ahmar H (2013) Electrosynthesis of amidazole derivative and its application as a bifunctional electrocatalyst for simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline, acetaminophen, and tryptophan at a multi-wall carbon nanotubes modified electrode surface. *Biosens Bioelectron* 40:608–614
 65. Liu GT, Chen HF, Lin GM, Ye PP, Wang XP, Jiao YZ, Guo YX, Wen Y, Yang HF (2014) One-step electrodeposition of graphene loaded nickel oxides nanoparticles for acetaminophen detection. *Biosens Bioelectron* 56:26–31
 66. Si W, Lei W, Han Z, Zhang Y, Hao Q, Xia M (2014) Electrochemical sensing of acetaminophen based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide composites. *Sensors Actuators B* 193:823–829
 67. Xu F, Ru HY, Sun LX, Zou YJ, Jiao Ch L, Wang TY, Zhang JM, Zheng Q, Zhou HY (2012) A novel sensor based on electrochemical polymerization of diglycolic acid for determination of acetaminophen. *Biosens Bioelectron* 37:27–30
 68. Beitollahi H, Mohadesi A, Mostafavi M, Karimi-Maleh H, Baghayeri M, Akbari A (2014) Voltammetric sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen, and tryptophan in pharmaceutical products. *Ionics* 20:729–736
 69. Pournaghi-Azar HM, Kheradmandi S, Saadatirad A (2010) Simultaneous voltammetry of paracetamol, ascorbic acid, and co-deine on a palladium-plated aluminum electrode: oxidation pathway and kinetics. *J Solid State Electrochem* 14:1689–1695
 70. Yang G, Yu L, Jia J, Zhao Z (2012) 4-aminobenzoic acid covalently modified glassy carbon electrode for sensing paracetamol at different temperatures. *J Solid State Electrochem* 16:1363–1368
 71. Houshmand M, Jabbari A, Heli H, Hajjizadeh M, Moosavi-Movahedi AA (2008) Electrocatalytic oxidation of aspirin and acetaminophen on a cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode. *J Solid State Electrochem* 12:1117–1128
 72. Raoof JB, Chekin F, Ojani R, Barari S, Anbia M, Mandegarad S (2012) Synthesis and characterization of ordered mesoporous carbon as electrocatalyst for simultaneous determination of epinephrine and acetaminophen. *J Solid State Electrochem* 16:3753–3760
 73. Yang G, Wang L, Jia J, Zhou D, Li D (2012) Chemically modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing paracetamol in acidic solution. *J Solid State Electrochem* 16:2967–2977
 74. Li S, Deng D-H, Pang H, Liu L, Xing Y, Liu S-R (2012) Preparation of electrochemically reduced graphene oxide-modified electrode and its application for determination of p-aminophenol. *J Solid State Electrochem* 16:2883–2889
 75. Ye D, Xu Y, Luo L, Ding Y, Wang Y, Liu X (2012) $\text{LaNi}_{0.5}\text{Ti}_{0.5}\text{O}_3/\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -based sensor for sensitive determination of paracetamol. *J Solid State Electrochem* 16:1635–1642

ARTÍCULO 3

Easy preparation of electrode surfaces
with dispersed size-controlled Au
nanoparticles by electrodeposited PPI-
dendrimers as templates



Easy Preparation of Electrode Surfaces with Dispersed Size-Controlled Au Nanoparticles by Electrodeposited PPI-Dendrimers as Templates

Carlos Villena,^a José Losada,^a Beatriz Alonso,^b Carmen M. Casado,^b and M. Pilar García Armada^{a,z}

^aDepartamento de Ingeniería Química Industrial y M. A., Universidad Politécnica de Madrid, 28006 Madrid, Spain

^bDepartamento de Química Inorgánica, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The main target of this work is the preparation of nanostructured surfaces with size-controlled gold nanoparticles to obtain effective electrocatalytic surfaces. In this paper, we show that dispersed Au nanoparticles (AuNPs) having diameters of less than 3 nm can be synthesized in situ with aminoferrocenyl- and amidoferrocenyl-poly(propyleneimine) (PPI) dendrimers previously electrodeposited onto electrode surfaces. Dendrimers of first, third and fifth generation have been studied and good dispersed non aggregated nanoparticles were obtained in all the cases. In a similar way than in homogeneous media, inter-dendrimer Au nanoparticles have been obtained when first or third generation dendrimer modified electrodes were used, while smaller nanoparticles were obtained with fifth generation dendrimer, indicating that intra-dendrimer Au nanoparticles have been synthesized. The AuNPs were obtained from a HAuCl₄ solution after chemical reduction with NaBH₄. The formation of AuNPs was followed by UV-Vis spectroscopy; electrochemistry and ultra-high resolution scan electron microscopy (HRSEM). The obtained electrodes have been successfully used for the tetraelectronic oxygen reduction reaction (ORR) with a low onset potential (0.00 V vs. SCE), high kinetic current densities and also high heterogeneous electron transfer rate constants.

© 2017 The Electrochemical Society. [DOI: 10.1149/2.1611706jes] All rights reserved.

Manuscript submitted February 13, 2017; revised manuscript received March 31, 2017. Published April 20, 2017.

Nanometer-scale gold particles (AuNPs) exhibit size-dependent optical and electronic properties of interest in the field of nanoscience and nanotechnology, and their applications stretch from catalysts¹⁻⁶ to sensors and biosensors.⁷⁻¹² In particular, it is known that AuNPs with diameters in the sub-nanometer to ~2 nm range show quite unique properties compared to those larger than 5 nm.^{13,14} This fact has motivated intense interest in the design of macromolecular architectures for the template synthesis of AuNPs with size between 1–2 nm in order to be further used in catalysis^{15,16} and sensor devices.¹⁷ Nanoparticles encapsulated in dendrimers and other molecular cages have been reported from 1998¹⁸ to date.¹⁹⁻²⁴ These materials were prepared by sequestering metal ions within dendrimers in solution followed by chemical reduction to yield the corresponding zerovalent metal nanoparticles. The size of such particles depends on the number of metal ions initially loaded into the macromolecule. Dendrimers are particularly interesting templates because they combine the physical and chemical searched properties with tunable solubility and surface reactivity. In addition, the nanoparticles size can also be controlled by the dendrimer structure and size, and the means by which the metal ions are coordinated into the dendrimer. Several dendrimers have been used for this purpose with different cores, type and number of repetitive branch units and terminal functional groups.²⁵⁻²⁹ It was demonstrated that the interaction of AuCl₄⁻ and poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM) comprise the formation of an ion pair between AuCl₄⁻ and a protonated tertiary amine, or of a chelate of Au(III) by one (or two) tertiary amine(s) and the terminal groups.^{25,30} The amide and amine groups in the PPI dendrimers' backbone play the same role in the formation of the ionic pairs with the AuCl₄⁻ ions.¹⁵ Also it has been demonstrated the influence of the dendrimer generation on the size of the resultant colloids:²⁵ lower-generation dendrimers give rise to larger Au colloids and those high-generations allow getting smaller Au colloids. This effect is due to both, number of available coordinating atoms and cavity size into the spherical shape of high-generation dendrimers, which address to form inter- or intra-dendrimer nanoparticles. However, the AuCl₄⁻ interaction and the cavity size do not control entirely the size of the formed nanoparticles. It was reported that AuNPs with improved monodispersity can be prepared by using the called "magic number"³¹ ratios of HAuCl₄:dendrimer.^{32,33} Specifically, AuNPs containing (on average) 55, 147, 561 and 1022 Au atoms were obtained within PAMAM dendrimers of generation 4, 6

and 8 by using ratios of these HAuCl₄ equivalents per dendrimer. So, the nanoparticles size and monodispersity are controlled in solution by the size and structure of dendrimer-template and by the ratio Au (III):dendrimer. More recently, AuNPs with diameters of 1.6 and 3.3 nm have been obtained on a polymer-wrapped stacked-graphene dispersed in aqueous ethylene glycol without using any capping agents.³⁴

In order to develop electrocatalytic applications, the obtained nanoparticles must be immobilized on electrode surfaces. The approaches reported to date take as alternatives the immobilization of NPs-dendrimers by adsorption on Au surfaces (this option provides very unstable systems), by covalent link to self-assembled monolayers (sometimes the system is not electrochemically active because of the insulating self-assembled layer between the electrode surface and the dendrimer),³⁵ by electrochemical immobilization to glassy carbon electrodes by potential cycles,^{36,37} by deposition of the NPs-dendrimer corresponding solution onto the working electrode and evaporation of the solvent,³⁸ by incorporation into conducting polymer matrixes³⁵ or on carbon nanotubes composites.¹⁹ Other authors have chosen to adsorb the dendrimers onto gold and platinum surfaces and deposit colloidal gold nanoparticles (55 nm) previously synthesized with sodium citrate.³⁹

In this article, we show that Au nanoparticles with good monodispersity can be easily synthesized in situ with aminoferrocenyl- and amidoferrocenyl-PPI dendrimers previously electrodeposited onto electrode surfaces. This fact constitutes a significant novelty in relation with other reported features, in which colloidal AuNPs are obtained in dendrimer solutions and must be firstly separated and then fixed to electrodes or other supports. An important key feature concerning the ferrocenyl dendrimers is their ability to modify electrodes, due to the solubility change associated to the ferrocene oxidation,⁴⁰⁻⁴³ resulting in electroactive material that remains persistently attached to the electrode surface. Even though ferrocene is also widely used as effective electrocatalyst (with reversible redox systems with E° about 0.51 and 0.40 for the amide- and amine-dendrimers respectively),^{41,44,45} here the functionalization with ferrocene is used to easily electrodeposit the dendrimer films. In addition, the surface coverage of dendrimer films can be determined from the integrated charge of the cyclic voltammetric waves of the electroactive ferrocenyl sites. We have used PPI dendrimers of generations 1, 3 and 5 to increase progressively the number of available coordinating atoms and the cavity size of the templates.²⁵ We pretend to observe the effects of these variables on the nanoparticles size. We report the fast and easy preparation

^zE-mail: pilar.garcia.armada@upm.es

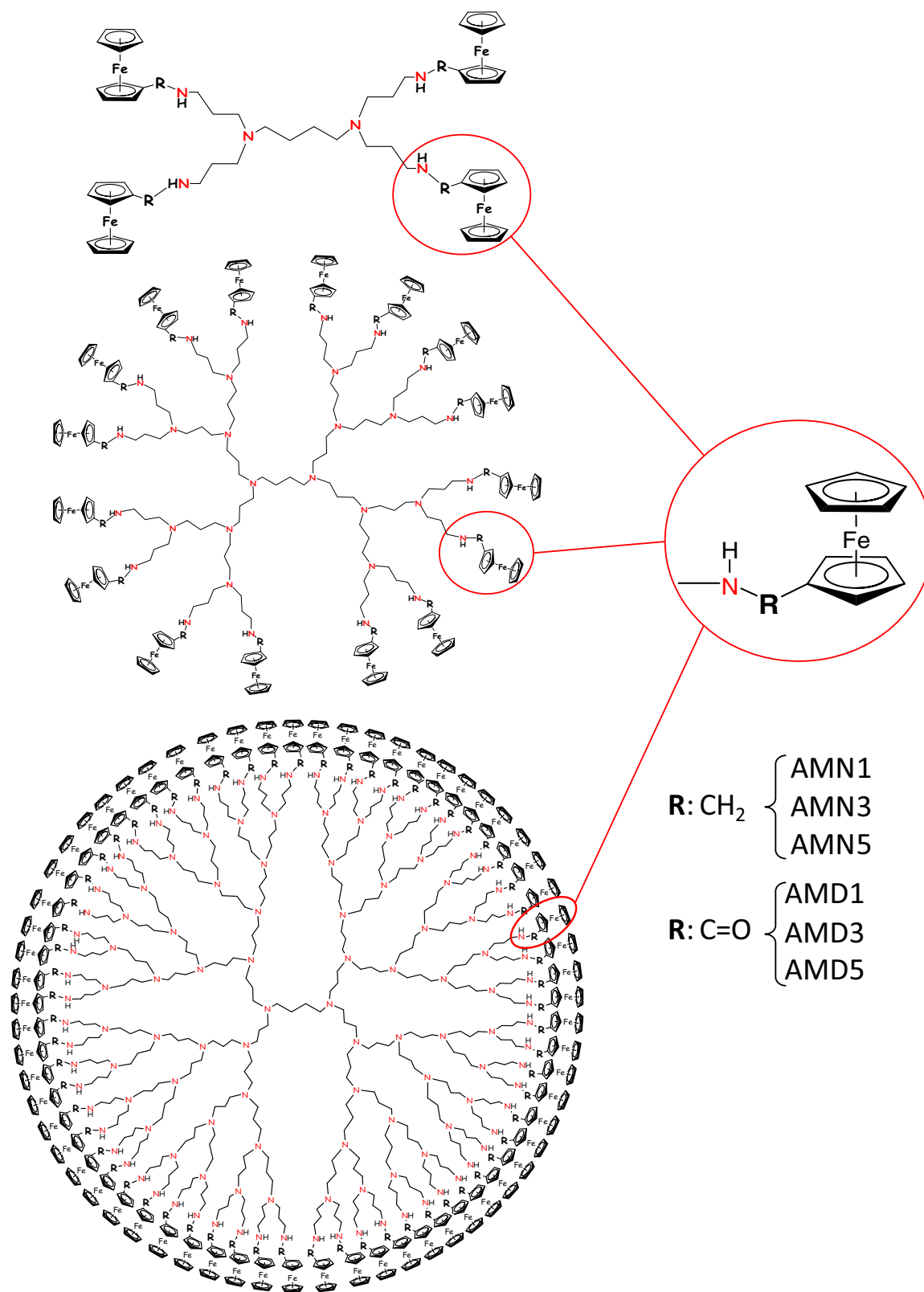


Figure 1. Ferrocenyl PPI-dendrimers' structure.

in situ of nanostructured effective electrocatalytic surfaces with inter- or intra-dendrimer gold nanoparticles size-controlled by the dendrimer generation. The results are significant because the in situ synthesis and catalytic applications of AuNPs with this degree of monodispersity in this size range have not been previously reported.

Experimental

Materials.—We have used two families of poly(propyleneimine) dendrimers (PPI) functionalized with amine and amide groups (Fig. 1) respectively: PPI-1-(NHCH₂Fc)₄ (AMN1), PPI-3-(NHCH₂Fc)₁₆ (AMN3) and PPI-5-(NHCH₂Fc)₆₄ (AMN5); and PPI-1-(NHCOFc)₄

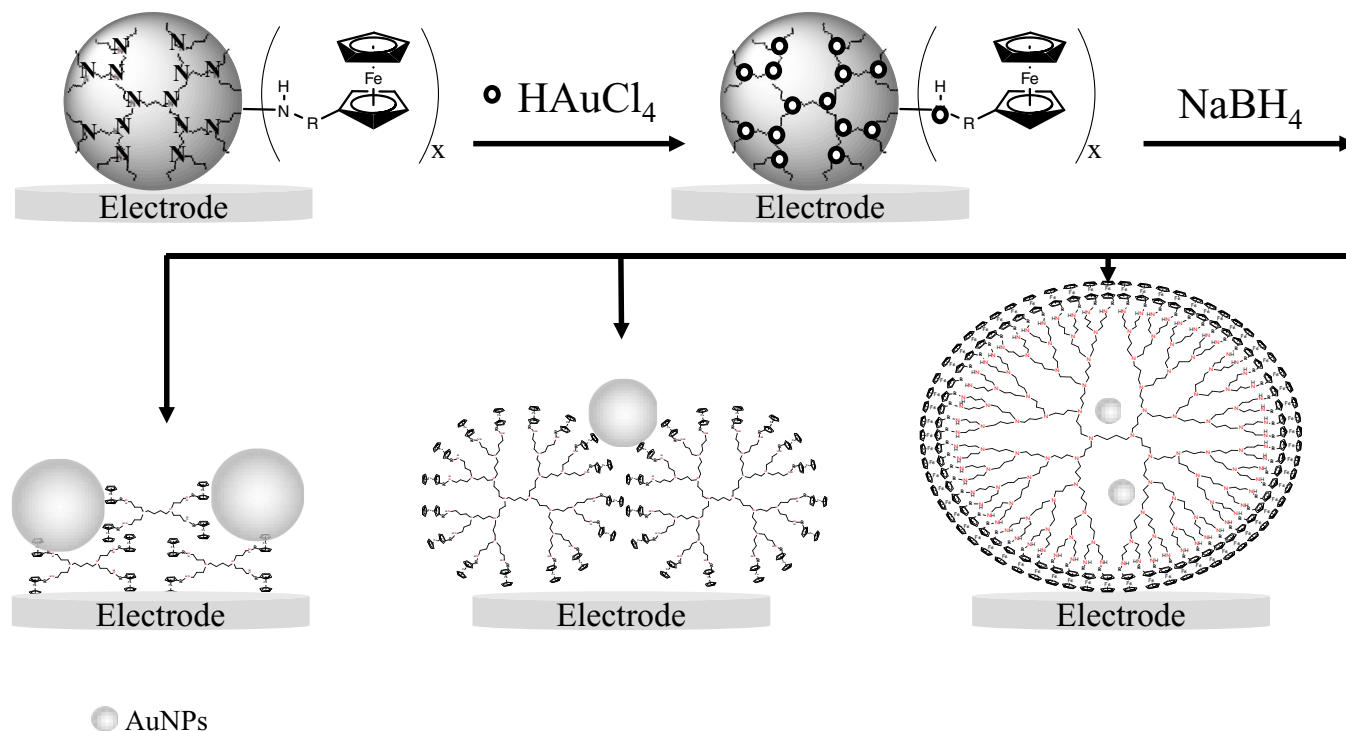


Figure 2. Scheme of in situ synthesis of size controlled AuNPs on the dendrimers as templates.

(AMD1), PPI-3-(NHCOFc)₁₆ (AMD3) and PPI-5-(NHCOFc)₆₄ (AMD5), synthesized as previously described.^{41,44} H₂O was purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals were analytical grade and were used without further purification. Ultrapure water was used for preparation of the buffers and standards, and for electrochemistry.

Instruments.—All electrochemical measurements were carried out using an Ecochemie BV Autolab PGSTAT 12. The experiments were performed in a conventional three-electrode cell at room temperature (20–22°C) with a Pt disk of 3 mm diameter as working electrode tips and a Pt wire as auxiliary electrode. A BAS non-aqueous Ag/Ag⁺ reference electrode and a saturated Calomel reference electrode (SCE) or Hg/HgSO₄ were employed in organic solvents and aqueous media respectively. In steady-state measurements, an Autolab rotating-disc electrode was used. The solutions were deoxygenated by bubbling high-purity nitrogen in all electrochemical measurements. The scanning electron microscope images were recorded on an ultra-high resolution scanning electron microscopy Philips XL30S FEG. UV-vis absorbance spectra were obtained using a Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis Spectrometer. The AFM tapping mode measurements were carried out with a Bruker AFM multimode Nanoscope III A. The UV-vis and AFM samples were prepared onto ITO modified electrodes. The oxygen measurements were carried out in an oxygen saturated 0.1 M NaClO₄ - 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 solution (PBS) at 22°C.

Electrodeposition of dendrimers.—Prior to coating, Pt disc electrodes were polished using 0.1 μm alumina powder and rinsed in ultrapure water in an ultrasonic bath. Each electrode surface was then conditioned by cycling the potential in 0.5 M H₂SO₄. Finally, the electrodes were rinsed successively with water and acetone and allowed to dry at room temperature. The dendrimer films were electrodeposited onto the Pt or ITO (for UV-Vis and AFM techniques) electrodes under potentiostatic control at +1.0 V (vs. Ag/Ag⁺) from a solution containing 10 μM in the redox-active species (ferrocene) and 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate in dichloromethane.

The coated electrodes were rinsed with dichloromethane and water. The surface coverage of electroactive ferrocenyl sites in the films, Γ, was determined from the integrated charge of the cyclic voltammetric waves before the AuNPs synthesis. The dendrimers-modified electrodes were stored at room temperature when not in use.

Synthesis of AuNPs.—The developed method is based in that used with dendrimers in solution.²⁷ Briefly, that procedure consists of two successive steps: the formation of the complex with the amine and/or amide groups, followed by the reduction of Au complex to zerovalent Au (Fig. 2). In this case, the dendrimer-modified Pt or ITO electrodes were dipped in a stirred H₂AuCl₄ 0.1 mM solution for 10 min and then rinsed with ultrapure water by dipping the modified electrode tip in vigorously stirred ultrapure water for a period of 5–10 min, to remove the uncoordinated ions, thus ensuring the sole reduction of coordinated Au ions. Next, the electrodes were dipped in a stirred 0.1 mM NaBH₄ - 0.3 M NaOH solution, during 10 min to reduce the Au ions and form the NPs. NaBH₄ was dissolved in NaOH in order to decrease the rate of reduction.²⁷ Finally, The modified electrodes were rinsed with ultrapure water.

For the AMN-dendrimers, in order to avoid the massive reduction of H₂AuCl₄ on the electrode surface by the ferrocenyl groups,⁴⁶ they were previously electrochemically oxidized at 0.55 V vs. SCE in 0.1 M KCl. Potassium chloride was used as support electrolyte to prevent the ionic exchange because Cl⁻ is a more coordinating ion than AuCl₄⁻. This pre-treatment is not necessary for the AMD-dendrimers because the electro-attracting effect of the amide group shifts the oxidation potential of ferrocene to more positive values.

Results and Discussion

Electrochemical characterization of modified electrodes.—The electrochemical characterization was carried out by cyclic voltammetry in deaerated H₂SO₄ 0.5 M, between 0.0 and 1.3 V vs. SCE at scan rate 100 mV s⁻¹. Figure 3 shows the obtained voltammograms for electrodes modified with the two families of dendrimers and AuNPs. The typical waves corresponding to the Au surface oxidation appear

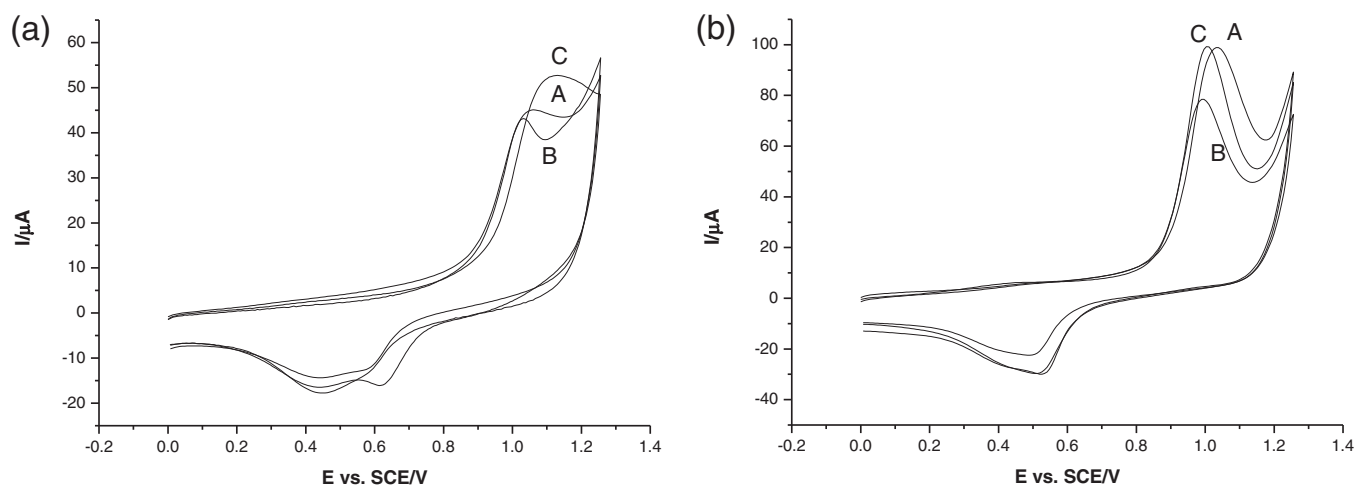


Figure 3. Steady-state cyclic voltammograms of (a) Au-AMN and (b) Au-AMD modified electrodes. The lines A, B and C correspond to the first, third and fifth generations respectively. Scan rate 100 mV s^{-1} .

in all CVs at about 1.0 V, and the reduction of the adsorbed oxygen monolayer⁴⁷ is observed in the potential range of 0.54–0.58 V, which indicates that AuNPs are formed on the electrode surface and remain electrochemically active. The oxide reduction peak was integrated and converted to total Au surface area using the widely accepted conversion factor of $390 \mu\text{C}/\text{cm}^2$.^{47,48} Table I contains the obtained average Au areas for electrodes modified with the two families of dendrimers, the dendrimer film average coverage used as template and the calculated total nitrogen atoms present in each film. If we consider gold nanoparticles with certain sizes, assuming spherical shape, it is possible to calculate their theoretical area and compare it with the effective area experimentally obtained (Table I). In this way, we can obtain an estimate of the total gold atoms deposited and relate it with the number of nitrogen atoms of dendrimer-templates. In accordance with other authors,^{27,49} we assume that each gold atom has a constant volume of $v_g = 17 \text{ \AA}^3$ (bulk fcc lattice) and the radius of the nanoparticles, R , is related with the number of gold atoms, n , by the equation:

$$n = 4\pi(R - \delta)^3 / (3v_g)$$

Where δ is the length of the surfactant-stabilizer ($\delta = 0$ in absence of surfactant). Table II contains, for five nanoparticle sizes, the radii and the theoretical areas thus calculated, and the number of Au atoms estimated for all the kinds of dendrimer electrodes. Comparison of Table II data with the nitrogen atoms in Table I allows us to estimate the most probable nanoparticles size range obtained with each template-generation. Values of Au atoms in bold are those in closer agreement with the number of coordinating nitrogen atoms present in each dendrimer film (Table I). This comparison indicates us that the nanoparticles tend to be smaller as the dendrimer generation increases, and support the hypothesis of formation of intra- and inter-dendrimer

nanoparticles with decreasing size as the dendrimer-generation increases. Effectively, this is the result of the available inner and outer dendrimer cavities, which must vary with the dendrimer generation in the same way that occurs in solution.^{25,35} In the films of generations 1 and 3, the inner nitrogen atoms are very accessible because of their more open structure, and the gold atoms located in neighboring dendrimers can interact during the reduction step. In this way, the AuNPs are formed with Au ions from several dendrimers and position in the inter-dendrimer holes. The upper generations are practically spherical and the nearest and less flexible peripheral functional groups restrict the interaction between ions coordinated with nearby dendrimers and cause the formation of intra-dendritic AuNPs. In fact, it has been demonstrated that peripheral groups of generations higher than 6 block the incoming ions and these dendrimers are not useful as templates.

Spectrometric characterization of the AuNPs.—The characteristic surface plasmon band of metallic nanoparticles can offer information about the NPs size. The study of this band requires a strict synthesis procedure in order to ensure the monodispersity of NPs. The Mie's theory⁵⁰ predicts that below a certain size, less than one-tenth of the optical wavelength, the position and width of this band should remain constant, independently of size. Nevertheless, more recently, other authors^{51,52} have studied the spectra of AuNPs between 1.7 nm and 4 nm and assert that gold nanocrystals of varying diameters between 2 and 4 nm exhibit distinct bands around 525 nm, the intensity of which increases with size and becomes rather small in the case of 1 nm diameter particles. This fact is attributed to a reduced number of itinerant electrons in the electron cloud and to that the HOMO±LUMO electronic gap decreases with particle size from 1.8 eV for Au₆ (~0.5 nm diameter) to 0.3 eV for Au₁₄₇ (~2 nm diameter). Two

Table I. Characteristics of dendrimer-templates and Au area.

Dendrimer	Amine groups ^a	Amide groups ^a	Γ^b (mol Fc cm ⁻²)	Nitrogen Atoms ^c	Au ^b (cm ²)
AMN1	6	-	$5.702 \cdot 10^{-10}$	$3.606 \cdot 10^{+13}$	0.0135
AMN3	30	-	$4.420 \cdot 10^{-10}$	$3.493 \cdot 10^{+13}$	0.0145
AMN5	126	-	$6.622 \cdot 10^{-10}$	$5.496 \cdot 10^{+13}$	0.0364
AMD1	2	4	$9.747 \cdot 10^{-10}$	$6.163 \cdot 10^{+13}$	0.0295
AMD3	14	16	$6.537 \cdot 10^{-10}$	$5.166 \cdot 10^{+13}$	0.0228
AMD5	62	64	$3.358 \cdot 10^{-10}$	$2.786 \cdot 10^{+13}$	0.0202

^aPer dendrimer molecule.

^bExperimental values obtained from electrochemical measurements.

^cCalculated for the Γ coverage.

Table II. Estimation of number of Au atoms coordinated by the N atoms in each dendrimer film.

Au atoms/NPs	R(Å)	Theoretical Area (cm ²)	Number of Au atoms*					
			AMN1	AMN3	AMN5	AMD1	AMD3	AMD5
55	6.07	4.63 · 10 ⁻¹⁴	1.60 · 10 ¹³	1.71 · 10 ¹³	4.31 · 10¹³	3.50 · 10 ¹³	2.71 · 10 ¹³	2.39 · 10¹³
147	8.42	8.91 · 10 ⁻¹⁴	2.22 · 10 ¹³	2.38 · 10 ¹³	5.99 · 10¹³	4.86 · 10 ¹³	3.76 · 10 ¹³	3.33 · 10¹³
309	10.79	10.79 · 10 ⁻¹⁴	2.84 · 10 ¹³	3.04 · 10¹³	7.65 · 10 ¹³	6.22 · 10¹³	4.80 · 10¹³	4.25 · 10 ¹³
561	13.16	13.16 · 10 ⁻¹⁴	3.45 · 10¹³	3.70 · 10¹³	9.30 · 10 ¹³	7.55 · 10¹³	5.83 · 10¹³	5.16 · 10 ¹³
1022	16.07	16.07 · 10 ⁻¹⁴	4.22 · 10¹³	4.53 · 10 ¹³	1.14 · 10 ¹⁴	9.25 · 10 ¹³	7.15 · 10 ¹³	6.33 · 10 ¹³

*Number of Au atoms = (Experimental area x Au atoms/NPs) / Theoretical area.

years ago, measurable plasmon bands were described²⁹ for dendrimer-stabilized AuNPs with 1.9 nm (545 nm), 2.0 nm (515 nm) and 3.7 nm (525 nm) average sizes prepared from dendrimer solutions. Figure 4 shows the plasmon bands observed for the NPs obtained with the six dendrimers as templates electrodeposited on ITO electrodes. Our experimental evidence also indicates a slight but significant shift to lower energy accompanied by a dramatic increase in width with decreasing size. In all spectra we can see the onset to strong absorption described by Whetten³¹ and the small Plasmon bands around 530 nm (520, 540 and 548 nm for Au-AMN1, Au-AMN3 and Au-AMN5; and 533, 527 and 569 nm for Au-AMD1, Au-AMD3 and Au-AMD5 respectively), coherent with the estimated sizes of particle and in good agreement with the literature. Note that the absorbance axes are amplified in order to distinguish the bands that are smaller than the observed by Astruc.²⁹ Unfortunately, the UV-vis spectra do not allow inferring the particle sizes, although they confirm the AuNPs presence and indicate that their size is very small.

Morphological characterization of modified electrodes.—Transmission Electron Microscopy (TEM) is the more usual method to characterize nanoparticles of such a small size. However, unfortunately, the need to oxidize the ferrocenyl unities to electrodeposit the templates prevents the TEM sample preparation. On the other hand, Atomic Force Microscopy (AFM), also tapping mode AFM, is not completely useful because even the ultra-thin tips sweep certain mass of dendrimer along, increasing the tip radius, and the AFM images show the distorted surfaces instead of the nanoparticles. Nevertheless, tapping mode AFM imaging has been useful to study the morphology and roughness of the dendrimer and Au-dendrimer films. Figure 5 displays the tapping mode AFM section analysis for the AMD and Au-AMD, and AMN and Au-AMN films deposited on ITO electrodes,

and Table III shows the results of the AFM study. It is quite evident that the dendrimer films undergo a drastic increase in the compactness after the AuNPs modification. The depth of the films, obtained from the AFM measurements, allowed us to compare their compactness as an apparent density calculated from the dendrimer coverage (g cm⁻²) divided by their depth (cm). Figure 6 shows the results of this comparison in which only the dendrimer mass (Table III) has been taken into account to estimate the effect of the intra- and inter-dendrimer AuNPs formation on the dendrimer films. As can be seen, before the synthesis of AuNPs, AMD-dendrimers form denser films than the AMN ones and this effect is more significant as the generation increases. This can be explained by the stronger intermolecular interactions by the presence of amide groups and by the faster increase of the molecular weight of the dendrimers than their estimated diameter (from 2.5 to 5.2 nm).⁴¹ On the other hand, it was reported⁴⁰ that the deposited first generation dendrimers behave rigidly, whereas those of generation 4 and upper exhibit viscoelastic behavior (generations 2 and 3 exhibit an intermediate behavior). It has been described that this behavior is responsible of a flattening of the dendrimers and produce denser films.

After the formation of AuNPs, both families of dendrimers show a similar behavior. The increase of films compactness due to the formation of the AuNPs can be explained by the existence of some adsorption of amine and amide groups on Au surface, in a similar way to that earlier described for PAMAM dendrimers.^{39,53,54} The dendrimers undergo deformation and flattening while adsorbing on surfaces due to multiple Au-amine interactions. If the size of NPs decreases as the dendrimers' generation increases, the available Au surface for the dendrimer adsorption should also decrease with the increasing dendrimer-size/AuNPs-area ratio. In addition, the nitrogen atoms become sterically hindered by the increasing compactness and spherical shape of the increasing generations, diminishing the adsorption

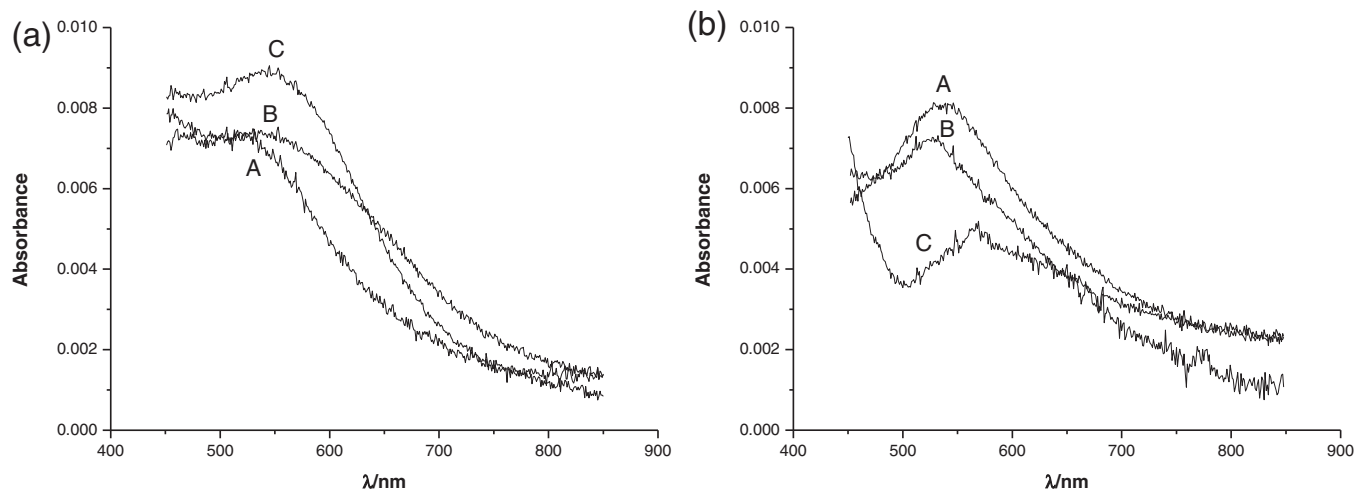


Figure 4. UV-vis spectra of ITOs modified with (a) Au-AMN and (b) Au-AMD films. The spectra correspond to the first (A), third (B) and fifth (C) generations of AMN and AMD dendrimers.

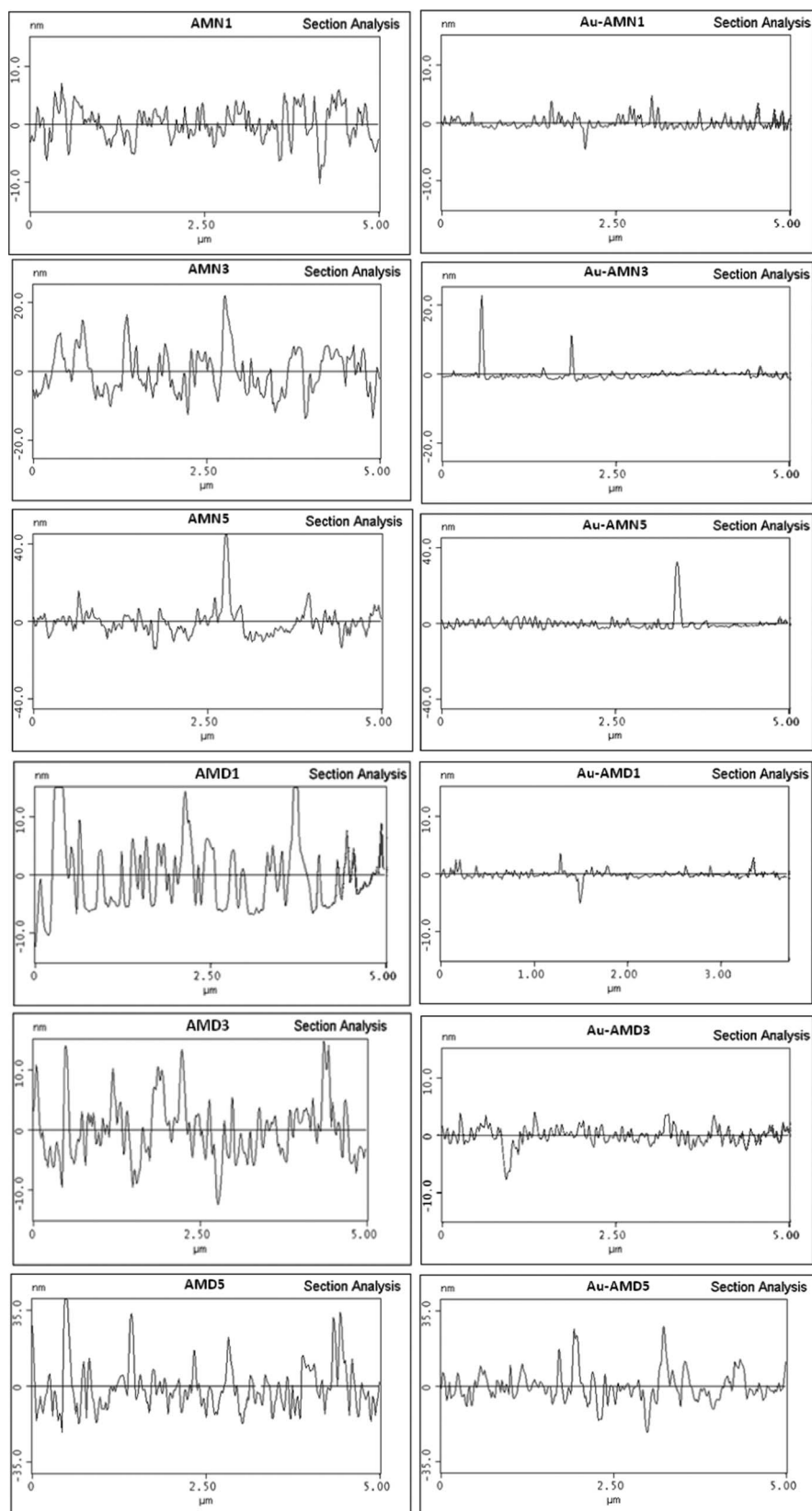


Figure 5. AFM section analysis of AMN and AMD dendrimers of 1st; 3rd and 5th generations without (left) and with AuNPs (right).

possibilities. For these reasons, the effect of this adsorption becomes more significant in the lower generation. Finally, the spongy of AMN films in relation with the AMD ones (Fig. 7a), probably causes the AuCl_4^- ions to be more deeply distributed into the AMN films, increasing the compactness, after the AuNPs formation, in all the

generations. These facts also are in agreement with the formation of inter- and intra-dendrimer AuNPs in the deposited films, as a function of the dendrimer generation.

The data in Table III also show that both Au-AMN and Au-AMD films presented more plain surfaces exhibiting very low dispersion in

Table III. Results of AFM study, arithmetic mean roughness (Ra), square average roughness (Rms) and relative surface area of the dendrimer and AuNPs-dendrimer films.

Film	Dendrimer mass (ng/cm ²)	Depth (nm)	Ra (nm)	Rms (nm)	Relative surface area
AMN1	8.41	16.60	2.067	2.660	1.056
AMN3	77.24	27.50	3.447	4.313	1.096
AMN5	740.89	132.00	3.823	5.192	1.103
AMD1	6.64	72.50	0.361	0.532	1.005
AMD3	184.06	288.00	1.706	2.201	1.047
AMD5	44.86	33.99	7.789	10.191	1.280
Au-AMN1	34.52	14.50	0.794	1.445	1.005
Au-AMN3	49.30	18.30	0.837	1.997	1.011
Au-AMN5	369.32	63.00	3.443	4.618	1.096
Au-AMD1	117.48	38.00	0.477	0.974	1.003
Au-AMD3	98.32	29.00	1.189	1.484	1.037
Au-AMD5	260.56	44.40	5.225	7.118	1.183

the roughness profile with the roughness increasing as the generation increases. Evidently, modifications on the film surface occurred during the formation of AuNPs giving more homogeneous films.

Ultra-resolution Scanning Electron Microscopy (HRSEM) is also a powerful tool to study nanostructured surfaces. Samples can be prepared in the same way than the modified electrodes and reflects faithfully the electrode surface, but the maximum resolution to automatically measure the nanoparticles diameter is only of 3.5 nm. However, although we cannot measure accurately the nanoparticles size, it is possible to compare the AuNPs obtained with the different generation dendrimers in order to assess the generation-effect on the NPs in situ preparation. Consequently, the dendrimer surfaces were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the AuNPs by HRSEM. The SEM micrographs of Pt wires modified with the dendrimers confirm that the AMD dendrimer films⁴⁵ are compact deposits, smoother, and denser than the more laminate AMN ones (Figure 7a). Figure 7b shows the obtained HRSEM images of the six AuNPs-dendrimer modified wires and the obtained maximum, minimum and majority average nanoparticle sizes for the six templates are collected in Table IV. The HRSEM analysis demonstrates that the NPs sizes decrease appreciably as the generation of dendrimer increases. The dendrimers of first generation give rise to nanoparticles with greater and more dispersed sizes, which confirms the majority formation of inter-dendrimer AuNPs. In these templates (AMN1 and AMD1), the control of the NPs size is only due to the concentration

of AuCl₄⁻ coordinated in the dendrimer template and the density of the film. As the densities of both films are close, the formation of larger NPs in the AMN1 template can be attributed to a greater Au skin loading by the ionic exchange of the chloride ions (counter ions of the ferrocenium groups) by AuCl₄⁻. As the generation increases, the ferrocenium groups of AMN dendrimers are less accessible for anion exchange and this effect becomes less significant. The films of the third generation dendrimers form smaller and less dispersed inter-dendrimer NPs because they have smaller inter-dendrimer holes. In relation with the AuNPs obtained from the fifth generation dendrimers, besides some few larger NPs, probably formed by the AuCl₄⁻ ions coordinated with the external nitrogen atoms, the majority of them are very small and uniformly distributed in the dendrimer films, as a cobblestone, with very low size dispersion, and their sizes are below the microscope resolution of 3.5 nm. From the visual comparison between NPs with sizes slightly higher than 3.5 nm and the obtained AuNPs, it is possible to assign an average size between 1 and 2 nm for the majority of them in both AMD5 and AMN5 templates.

Electrocatalytic applications.—Oxygen is considered the best cathodic clean fuel because of its abundance and high redox potential to form water and is a common target in the electrocatalysis field. Several authors have developed electrodes modified with metallic nanoparticles with good properties as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction (ORR). They examined the effect of nanoparticles size on the kinetics of the ORR, generally of Pt or Au@Pt nanoparticles^{35–37,55} and found that the kinetics of the ORR decrease with decreasing particle size.¹⁵ However the AuNPs smaller than 2 nm with a narrow diameter distribution loaded on conducting supports have a high catalytic activity for the ORR and are considered as one of the alternative catalyst of platinum nanoparticles.³⁴ As a function of the electrode material and solution composition, the ORR proceeds via two different pathways; a two-electron-transfer process yielding H₂O₂ or a four-electron-transfer process to yield H₂O. The ORR is a type of surface sensitive reaction in which the type of electrode material strongly affects the catalytic activity. Several studies have shown that a two-electron reduction pathway takes place on bulk Au electrodes at low overpotentials in acid media, with the first electron transfer being the rate-determining step. Indeed, recent reports of cathodes with AuNPs show two-electronic oxygen reduction^{34,57} or a succession of two bielectronic steps involving hydrogen peroxide as an intermediate species.⁵⁸ Very recently it has been reported a high-performance ORR catalyst based on gold nanoclusters supported on carbon nanosheets showing a tetra-electronic oxygen reduction.⁵⁹ In view of this report, we expect that the AuNPs obtained from the fifth generation dendrimers show the best catalytic behavior for the ORR because their small size and narrow distribution. We show the responses of AMN and AuNPs-AMN electrodes for the first and fifth generations because AMD dendrimer shows a similar response with a little smaller current and the electrodes modified with the third generation show a similar behavior than those modified with the first.

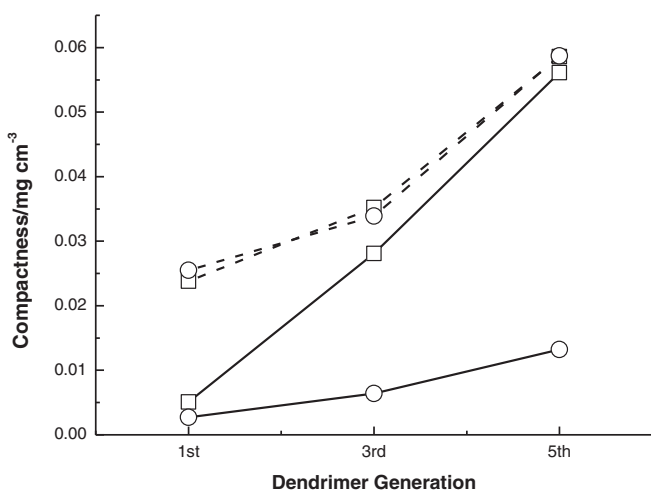


Figure 6. Density of dendrimer films estimated from the dendrimer coverage and the AFM depth measurements. The round symbols correspond to AMN and the square ones to AMD dendrimers respectively. The dashed lines represent the corresponding Au-dendrimers. The Au-dendrimer compactness has been calculated taking into account only the dendrimer mass.

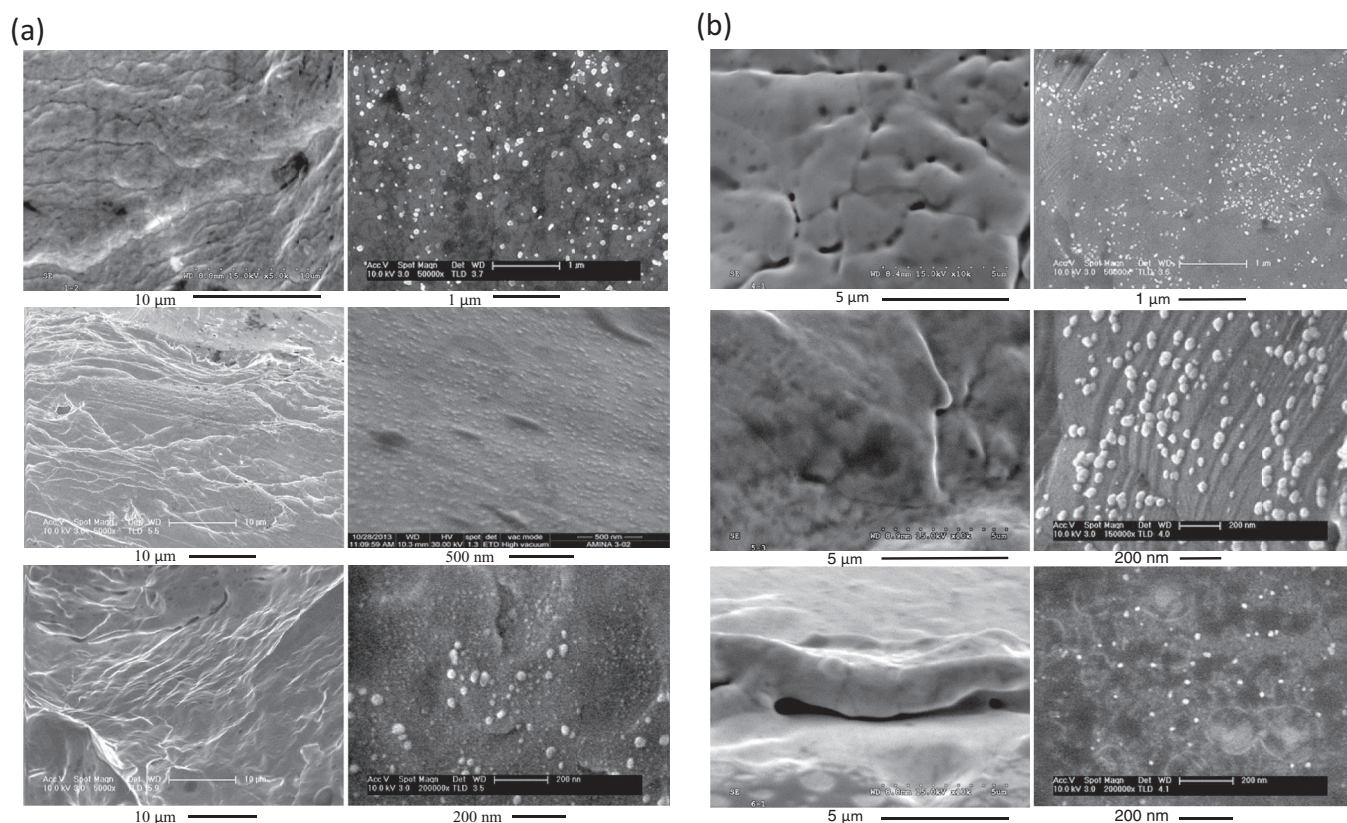


Figure 7. SEM (left) and HRSEM (right) micrographs of platinum wire electrodes modified with (a) AMN1, AMN3 and AMN5 at left, from top to bottom, and Au-AMN of three generations respectively at right, from top to bottom. (b) AMD1, AMD3 and AMD5, at left, from top to bottom, and Au-AMD at left ordered in the same way.

In our case, the ferrocenyl dendrimers are themselves good catalysts of oxygen reduction and the improvement due to the AuNPs have been studied. Figures 8a and 8b show the cyclic voltammograms obtained with AMN1 and AMN5 without and with AuNPs respectively. As can be seen from both figures, the ferrocenyl polymers move the onset forward to positive values, and increase the cathodic current indicating a catalytic behavior in comparison with the Pt bare electrode. In addition, the presence of AuNPs seems to have more influence on the fifth generation than on the first. All these results are in agreement with the formation of smaller nanoparticles with the fifth generation dendrimers. In agreement with other authors,⁵⁷ two consecutive two electron reduction steps of O₂ are observed on first generation modified electrodes, more accentuated in the cyclic voltammograms of Figure 8a. Electrodes modified with dendrimers of the fifth generation also show a little first step around -0.1 V (see Figure 8b) but less appreciable than in the first generation.

The ORR activity was studied in oxygen saturated PBS solution using a rotating disk electrode and the data were analyzed by the

Koutecky-Levich equation:

$$\frac{1}{j} = \frac{1}{nFkC_0} + \frac{1}{0.62nFC_0D_0^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2}}$$

Where j is the measured current density, ω is the electrode rotation in rad s⁻¹, n is the overall number of electrons transferred in the oxygen reduction reactions, F is the Faraday constant ($F = 96485.4$ C mol⁻¹), C_0 is the concentration of molecular oxygen ($1.3437 \cdot 10^{-6}$ mol cm⁻³)⁶⁰ under atmospheric pressure, D_0 is the diffusion coefficient of O₂ ($2.01 \cdot 10^{-5}$ cm² s⁻¹), k is the heterogeneous electron transfer rate constant, and ν is the kinematic viscosity of the aqueous solution (0.01 cm² s⁻¹).^{34,59}

Figures 9a to 8d show the steady-state linear voltammograms recorded on AMN1, Au-AMN1, AMN5 and Au-AMN5 modified electrodes respectively at several rotation rates. The onset potentials of the ORR are 0.00 V vs. SCE for the Au-dendrimer electrodes, even at low rotation rates. Noteworthy, this onset is the lowest overpotential ever reported for Au-NPs.^{34,57,59} The average number of electrons, n ,

Table IV. AuNPs sizes measured from the HRSEM analysis.

Template	Density* (g cm ⁻³)	Max. size (nm)	Min. size (nm)	Majority size (nm)
AMN1	0.003	100	5	80
AMN3	0.025	36	9	23
AMN5	0.042	25	1-2	1-2
AMD1	0.002	66	5	60
AMD3	0.046	50	7	37
AMD5	0.123	25	1-2	1-2

*Calculated from AFM data of the dendrimer films.

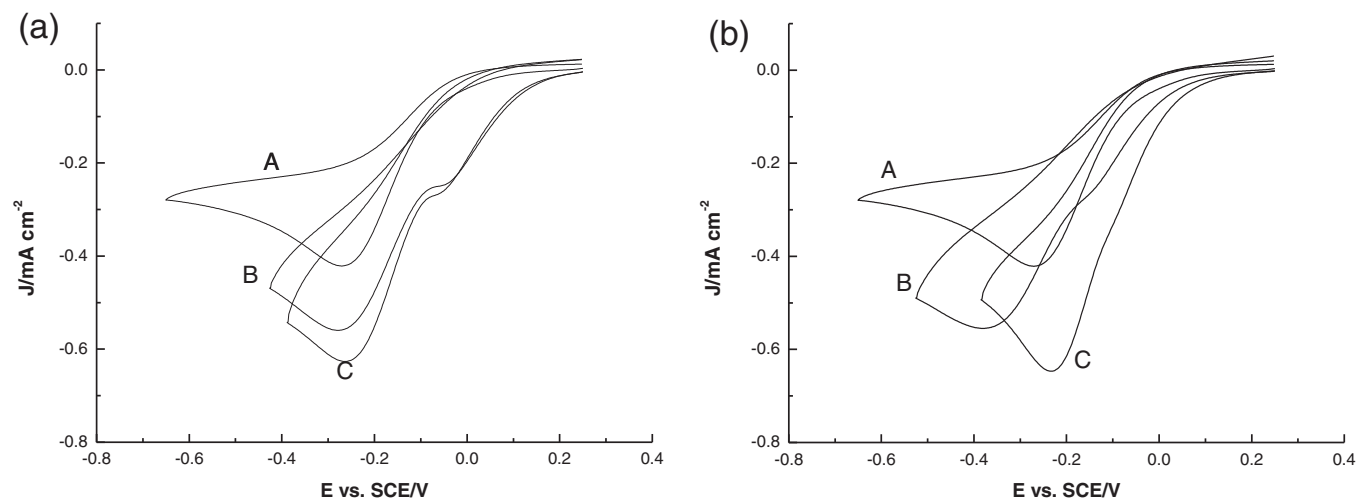


Figure 8. Cyclic voltammograms of (a) a Pt bare (A), an AMN1 ($\Gamma = 3.4 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (B) and an Au-AMN1 ($\Gamma = 4.8 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (C) electrodes, and of (b) a Pt bare (A), an AMN5 ($\Gamma = 8.0 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (B) and an Au-AMN5 ($\Gamma = 7.0 \cdot 10^{-10} \text{ mol Fc cm}^{-2}$) (C) electrodes. All in an oxygen saturated ($1.3437 \cdot 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$) PBS solution. Scan rate 20 mV s^{-1} .

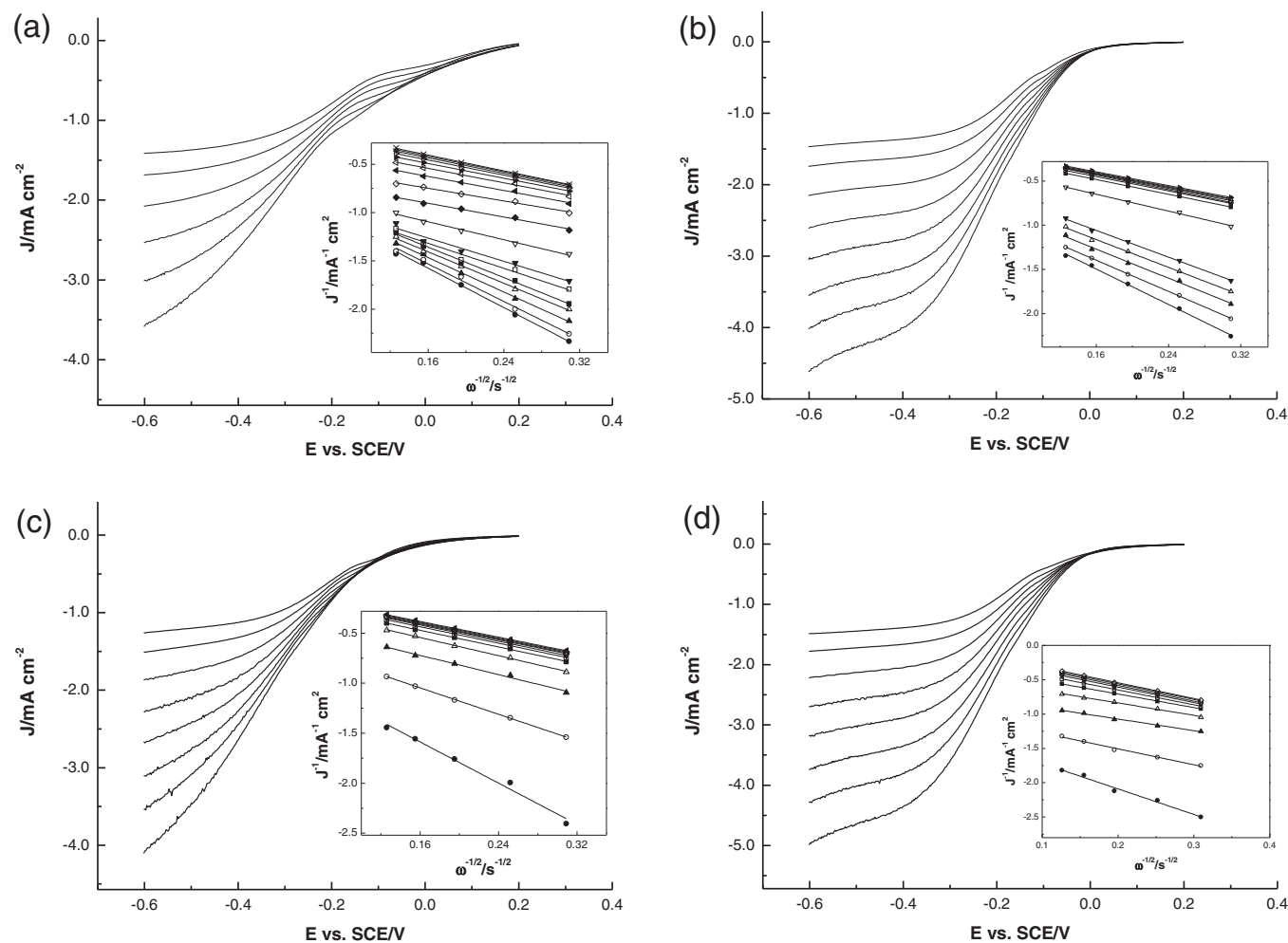


Figure 9. Steady-state voltammograms recorded on AMN1 (a), Au-AMN1 (b), AMN5(c) and Au-AMN5 (d) modified electrodes in oxygen saturated PBS solution using rotation rates between 100 and 2000 rpm. Scan rate 5 mV s^{-1} . Insets: Koutecky-Levich plots at potentials (a) $-0.09, -0.1, -0.11, -0.12, -0.13, -0.14, -0.15, -0.18, -0.22, -0.26, -0.3, -0.35, -0.4, -0.45, -0.5, -0.55$ and -0.6 ; (b) $-0.11, -0.12, -0.13, -0.14, -0.15, -0.22, -0.3, -0.35, -0.4, -0.45, -0.5, -0.55$ and -0.6 ; (c) $-0.15, -0.25, -0.3, -0.35, -0.4, -0.45, -0.5, -0.55$ and -0.6 ; and (d) $-0.1, -0.15, -0.20, -0.25, -0.3, -0.35, -0.4, -0.45, -0.5, -0.55$ and -0.6 .

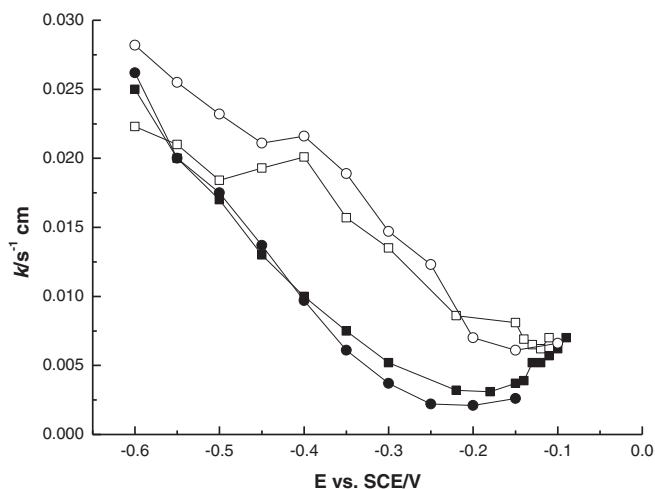


Figure 10. Variation of the heterogeneous electron transfer rate constants of AMN1, Au-AMN1 (square symbols, fitted and empty respectively), AMN5 and Au-AMN5 (round symbols, fitted and empty respectively). Average values obtained from the respective Koutecky-Levich plots.

obtained from the Koutecky-Levich plots of AMN1 electrodes (inset in Figure 9a) are 2.03, from -0.09 V to -0.15 V, and 4.08 from -0.22 V; and 1.90 from -0.11 to -0.15 and 3.94 from -0.20 V with the Au-AMN1 electrodes (inset in Figure 9b). The average number of electrons obtained for the AMN5 and Au-AMN5 electrodes were respectively 2.21 and 1.99 to -0.15 V; and 4.08 and 3.97 from -0.20 V (insets in Figures 9c and 9d).

In relation with the current density, the Au-AMN5 reaches higher values than Au-AMN1 and Au-AMN3 (not shown) and is ranked among the best last reported AuNPs ORR catalysts.^{34,57–59}

From the Koutecky-Levich intercepts, the corresponding heterogeneous electron transfer rate constants, k , have been calculated for several potential values. Figure 10 shows the comparison between the obtained values for the electrodes modified with the dendrimers and the Au-dendrimers of first and fifth generations. As it can be seen, the differences between the films without and with AuNPs are well shown. The rate constant of Au-dendrimers are higher from -0.1 V and reach a maximum around -0.4 V. In addition, Au-AMN5 shows a faster kinetics than Au-AMN1 only due to the AuNPs because no difference is observed between the AMN1 and AMN5 modified electrodes.

The robustness of the Au-dendrimer electrodes was studied for one month, making daily series of twenty voltammograms keeping constant the oxygen concentration. All the electrodes remain their entire ORR activity for this period, indicating that the AuNPs are stable and do not tend to aggregate into larger particles during the sample processing.

Conclusions

In this work intra- and inter-dendrimer AuNPs have been obtained for the first time by means of aminoferrocenyl- and amidoferrocenyl-PPI dendrimer-templates previously electrodeposited onto the electrode surface. The oxidation of ferrocenyl groups made possible the electrochemical deposition of templates, and the nitrogen atoms of PPI interact with the chloroaurate ions. In view of the impossibility of carrying out the TEM characterization, all the AuNPs were characterized by electrochemical measurements, UV-visible spectroscopy, AFM and HRSEM. The dependence on the dendrimer generation of the number of held Au ions and their interaction possibilities, the sizes of obtained holes and the porosity and density of AMD and AMN films, allowed us to prepare AuNPs with generation-dependent sizes.

The developed electrodes were applied as ORR catalysts with different results as a function of the AuNPs size and therefore of the den-

drimer generation. The first and third generation Au-dendrimer electrodes exhibited two consecutive two-electronic steps for the ORR; however, the fifth generation dendrimers which forms smaller AuNPs, especially Au-AMN5, show a tetra-electronic mechanism for the O_2 reduction with a low onset potential (0.00 V vs. SCE), a high kinetic current density and also a high heterogeneous electron transfer rate constant. Thus, an easy method to obtain size-controlled AuNPs by electrodeposited dendrimer templates and their application as ORR catalysts has been reported. This work opens new research lines in which other interesting properties of these films can be exploited. Effectively, the limited access to the catalyst as filter to interferents, the ability of the amide and amine groups to form hydrogen bonds, or the synergic electrocatalytic properties of ferrocene are very promising characteristics to develop news applications. Further work will be focused to obtain specific electrocatalysts with size-controlled nanoparticles for other reactions of interest as well as in the field of electrochemical sensors and biosensors, where the AuNPs size is critical not only as catalyst, but as immobilization platform or to achieve enzyme direct electrochemistry.

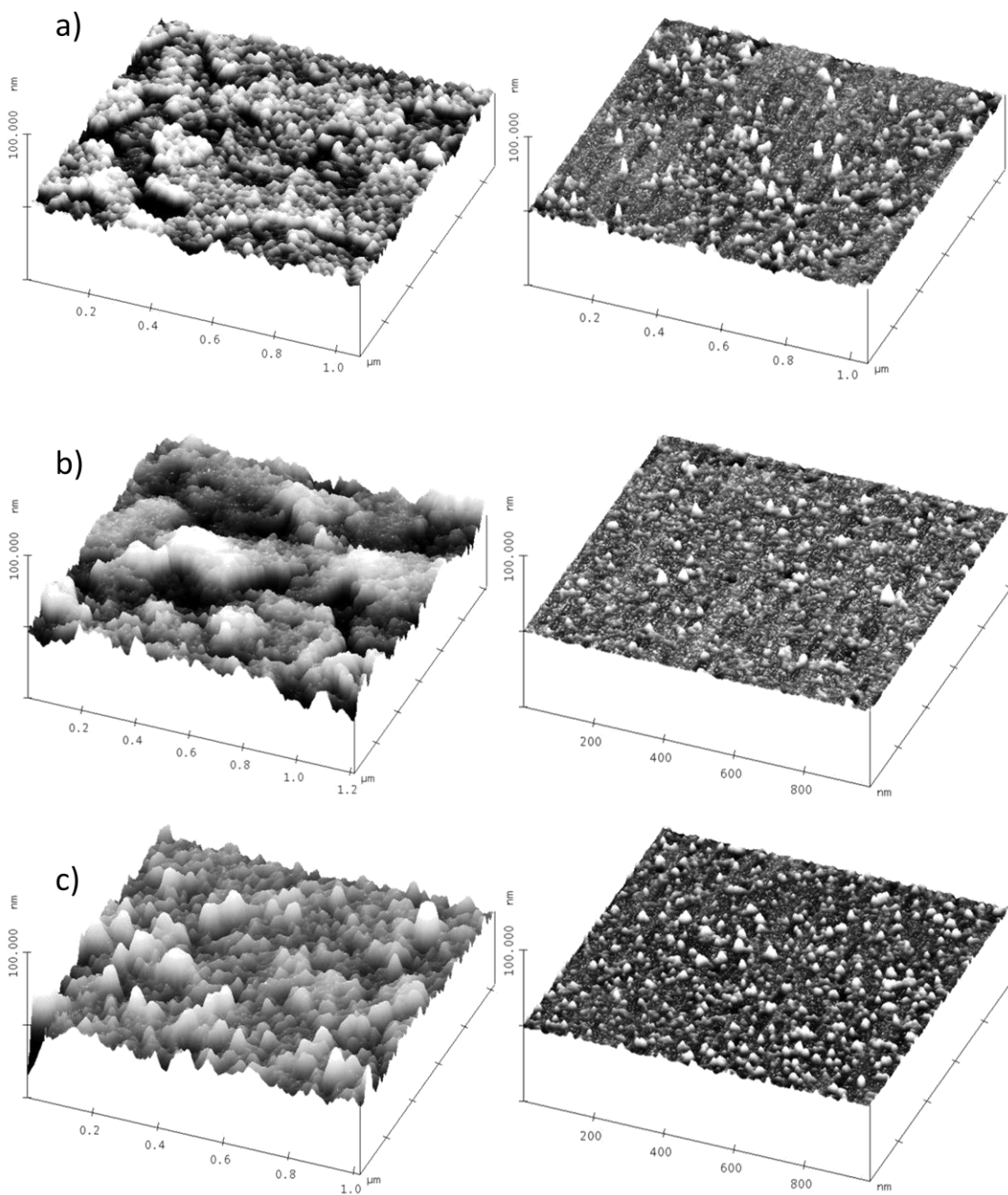
Acknowledgments

The authors thank the Spanish Dirección General de Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Project No. CTQ-2009-12321-C02) for financial support of this research. C. Villena acknowledges the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral fellowship (BES-2010-028705). We thank the ICTS Centro Nacional de Microscopia Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid for assistance in the AFM study.

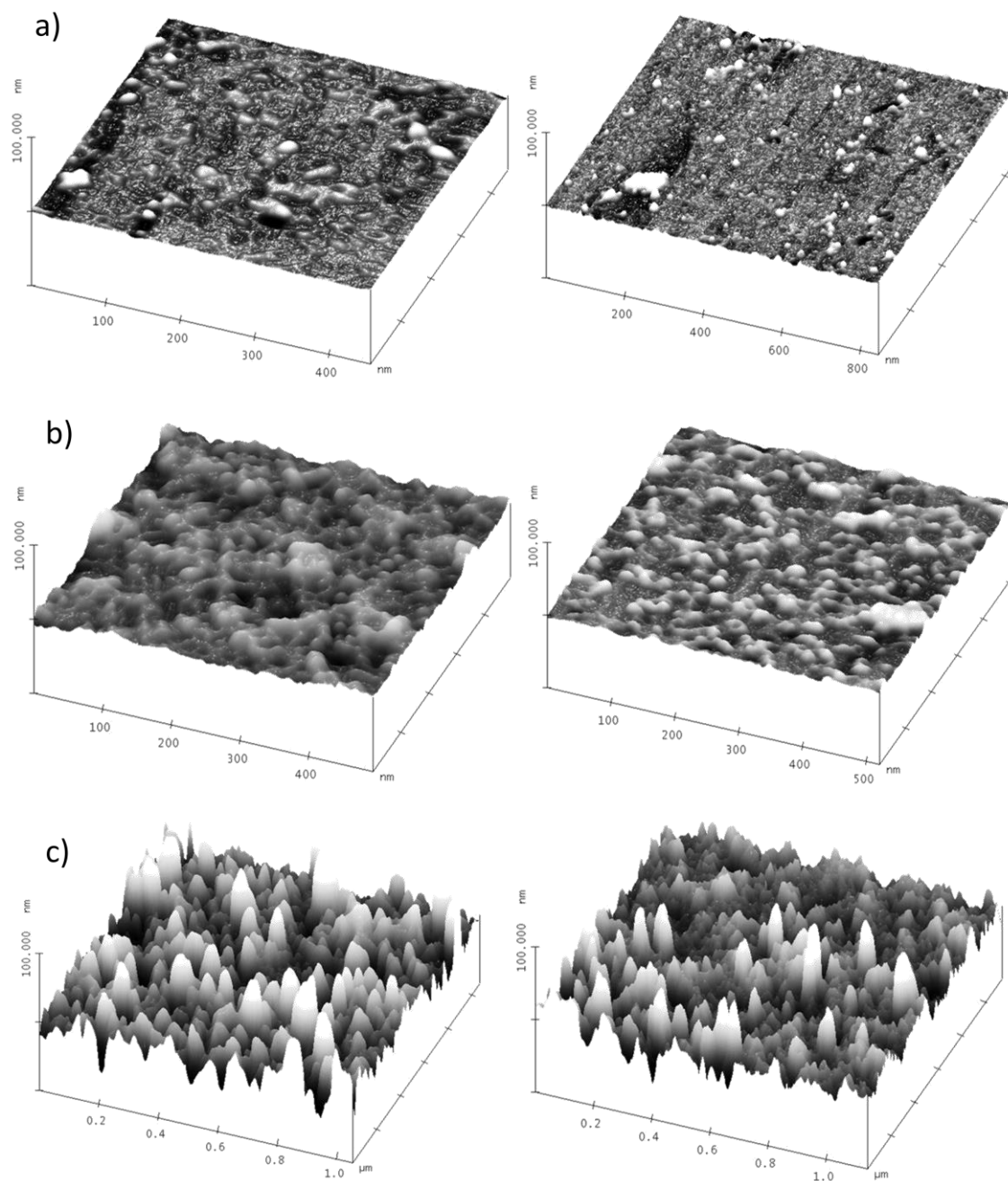
References

- M. C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev.*, **104**, 293 (2004).
- M. Stratakis and H. Garcia, *Chem. Rev.*, **112**, 4469 (2012).
- T. Mitsudome and K. Kaneda, *Green Chem.*, **15**, 2636 (2013).
- B. R. Cuenya, *Acc. Chem. Res.*, **46**, 1682 (2013).
- B. S. Takale, M. Bao, and Y. Yamamoto, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 2005 (2014).
- X. Zhou, W. Xu, G. Liu, D. Panda, and P. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 138 (2010).
- J. M. Pingarrón, P. Yañez-Sedeño, and A. Gonzalez-Cortes, *Electrochim. Acta*, **53**, 5848 (2008).
- M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, *Front. Chem.*, **2**, 63 (2014).
- C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, and Y. Lin, *Anal. Chem.*, **87**, 230 (2015).
- R. S. Moakhar, G. K. L. Goh, A. Dolatia, and M. Ghorbani, *Appl. Catal. B-Environ.*, **201**, 411 (2017).
- R. S. Moakhar, G. K. L. Goh, A. Dolati, and M. Ghorbani, *Electrochem. Commun.*, **61**, 110 (2015).
- P. A. Rasheed and N. Sandhyarani, *Microchim. Acta*, **184**, 981 (2017).
- C. M. Aikens, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2**, 99 (2011).
- R. Jin, *Nanoscale*, **2**, 343 (2010).
- V. S. Myers, M. G. Weir, E. V. Carino, D. F. Yancey, S. Pande, and R. M. Crooks, *Chem. Sci.*, **2**, 1632 (2011).
- D. Astruc, L. Y. Liang, A. Rapakousiou, and J. Ruiz, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 630 (2012).
- A. Rapakousiou, R. Djeda, M. Grillaud, N. Li, J. Ruiz, and D. Astruc, *Organometallics*, **33**, 6953 (2014).
- M. Zhao, L. Sun, and R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4877 (1998).
- X. Lu and T. Imae, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 2416 (2007).
- R. McCaffrey, H. Long, Y. Jin, A. Sanders, W. Park, and W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 1782 (2014).
- H. Imoto, K. Ishida, A. Sasaki, Y. Irie, H. Ito, K. Naka, and Y. Chujo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 653 (2015).
- A. K. Ilunga and R. Meijboom, *Appl. Catal. A*, **509**, 17 (2016).
- M. Baccarin, B. C. Janegitz, R. Berté, F. Campanhã, C. E. Banks, O. Fatibello-Filho, and V. Zucolotto, *Mater. Sci. Eng. C*, **58**, 97 (2016).
- D. Astruc, D. Wang, C. Deraedt, L. Liang, R. Ciganda, and J. Ruiz, *Synthesis-Suttgart*, **47**, 2017 (2015).
- M. E. Garcia, L. A. Baker, and R. M. Crooks, *Anal. Chem.*, **71**, 256 (1999).
- K. Toriogo, A. Suzuki, and K. Esumi, *J. Colloid Interface Sci.*, **241**, 346 (2001).
- Y. G. Kim, S. K. Oh, and R. M. Crooks, *Chem. Mater.*, **16**, 167 (2004).
- D. Astruc, C. Ornelas, and J. Ruiz, *Acc. Chem. Res.*, **41**, 841 (2008).
- Y. Wang, L. Salmon, J. Ruiz, and D. Astruc, *Nat. Commun.*, **5**, 3489 (2014).
- S. K. Oh, Y. G. Kim, H. Ye, and R. M. Crooks, *Langmuir*, **19**, 10420 (2003).
- M. Brack, *Sci. Am.*, **277**, 50 (1997).
- J. C. García-Martínez and R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16170 (2004).
- V. Petkov, N. Bedford, M. R. Knecht, M. G. Weir, R. M. Crooks, W. Tang, G. Henkelman, and A. Frenkel, *J. Phys. Chem. C*, **112**, 8907 (2008).
- T. Fujigaya, C. R. Kim, Y. Hamasaki, and N. Nakashima, *Sci. Rep.*, 21314 (2016).
- R. W. J. Scott, O. M. Wilson, and R. M. Crooks, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 692 (2005).

36. H. Ye and R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4930 (2005).
37. D. F. Yancey, E. V. Carino, and R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10988 (2010).
38. M. Bernechea, S. García-Rodríguez, P. Terreros, E. de Jesús, J. L. G. Fierro, and S. Rojas, *J. Phys. Chem. C*, **115**, 1287 (2011).
39. P. P. Fang, O. Buriez, E. Labbé, Z. Q. Tian, and C. Amatore, *J. Electroanal. Chem.*, **659**, 76 (2011).
40. K. Takada, D. J. Díaz, H. D. Abruña, I. Cuadrado, C. M. Casado, B. Alonso, M. Morán, and J. Losada, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10763 (1997).
41. I. Cuadrado, M. Morán, C. M. Casado, B. Alonso, F. Lobete, B. García, M. Ibisate, and J. Losada, *Organometallics*, **15**, 5278 (1996).
42. B. Alonso, M. Morán, C. M. Casado, F. Lobete, J. Losada, and C. Cuadrado, *Chem. Mater.*, **7**, 1440 (1995).
43. C. M. Casado, B. Alonso, J. Losada, and M. P. García Armada, in S. Campagna, P. Ceroni, and F. Puntoriero, (Eds.), *Wiley book on Designing Dendrimers*, p. 219, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2012).
44. A. Salmon and P. Jutzi, *J. Organomet. Chem.*, **595**, 637 (2001).
45. M. P. García Armada, E. Vallejo, C. Villena, J. Losada, C. M. Casado, and B. Alonso, *J. Solid State Electr.*, **20**, 1551 (2016).
46. L. Lian, J. Ruiz, and D. Astruc, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **20**, 503 (2010).
47. S. Trasatti and O. A. Petrii, *Pure and Appl. Chem.*, **63**, 711 (1991).
48. D. F. Yancey, L. Zhang, R. M. Crooks, and G. Henkelman, *Chem. Sci.*, **3**, 1033 (2012).
49. D. V. Leff, P. C. Ohara, J. R. Health, and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, **99**, 7036 (1995).
50. G. Mie, *Ann. Phys.*, **25**, 377 (1908).
51. M. M. Alvarez, J. T. Houry, T. G. Schaaff, M. N. Shafigullin, I. Vezmar, and R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3706 (1997).
52. C. N. R. Rao, G. U. Kulkarni, P. John Thomas, and P. P. Edwards, *Chem. Eur. J.*, **8**, 28 (2002).
53. M. Zao, H. Tokuhisa, and R. M. Crooks, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 2596 (1997).
54. H. Tokuhisa, M. Zao, L. A. Baker, V. T. Phan, Dermody, M. D. García, R. F. Pez, R. M. Crooks, and T. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4492 (1998).
55. S. Lankiang, M. Chiwata, S. Baranton, and H. Uchida, *Electrochim. Acta*, **182**, 131 (2015).
56. R. M. Félix-Navarro, M. Beltrán-Gastélum, E. A. Reynoso-Soto, F. Paraguay-Delgado, G. Alonso-Núñez, and J. R. Flores-Fernández, *Renew. Energ.*, **87**, 31 (2016).
57. P. Rameshkumar, R. Praveen, and R. Ramaraj, *J. Electroanal. Chem.*, **754**, 118 (2015).
58. G. Gotti, D. Evrard, K. Fajerwerg, and P. Gros, *J. Solid State Electrochem.*, **20**, 1539 (2016).
59. Q. Wang, L. Wang, Z. Tang, F. Wang, W. Yan, H. Yang, W. Zhou, L. Li, X. Kanga, and S. Chen, *Nanoscale*, **8**, 6629 (2016).
60. L. H. Gevantman, in D. R. Lide, (Ed.) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 8 (2005).

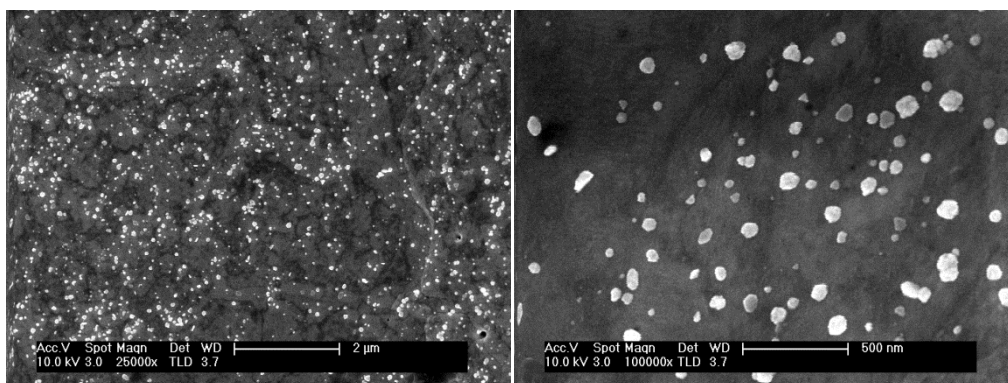


AFM of AMN dendrimers of a) 1st, b) 3rd and c) 5th generations without (left) and with AuNPs (right).

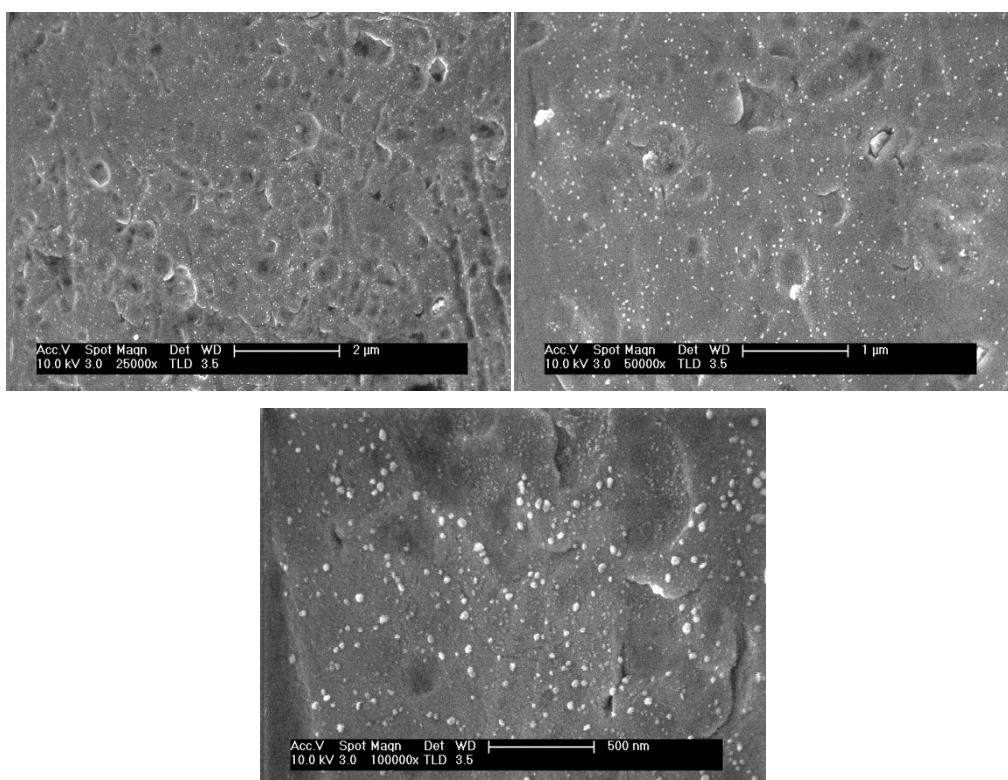


AFM of AMD dendrimers of a) 1st, b) 3rd and c) 5th generations without (left) and with AuNPs (right).

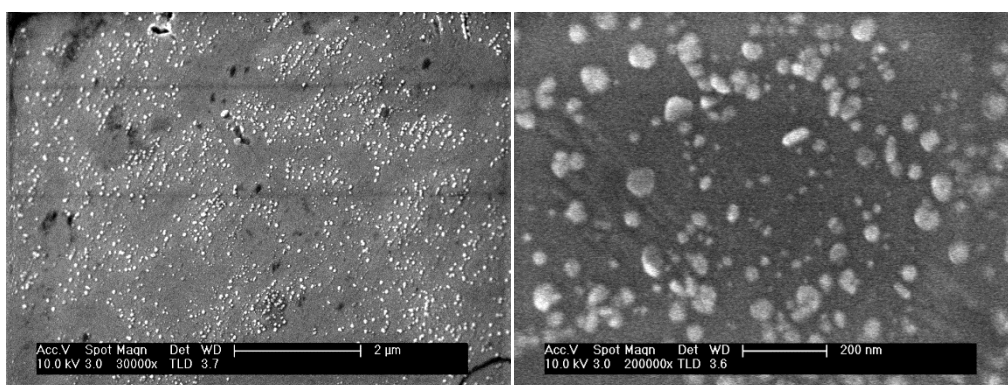
Other HRSEM micrographs



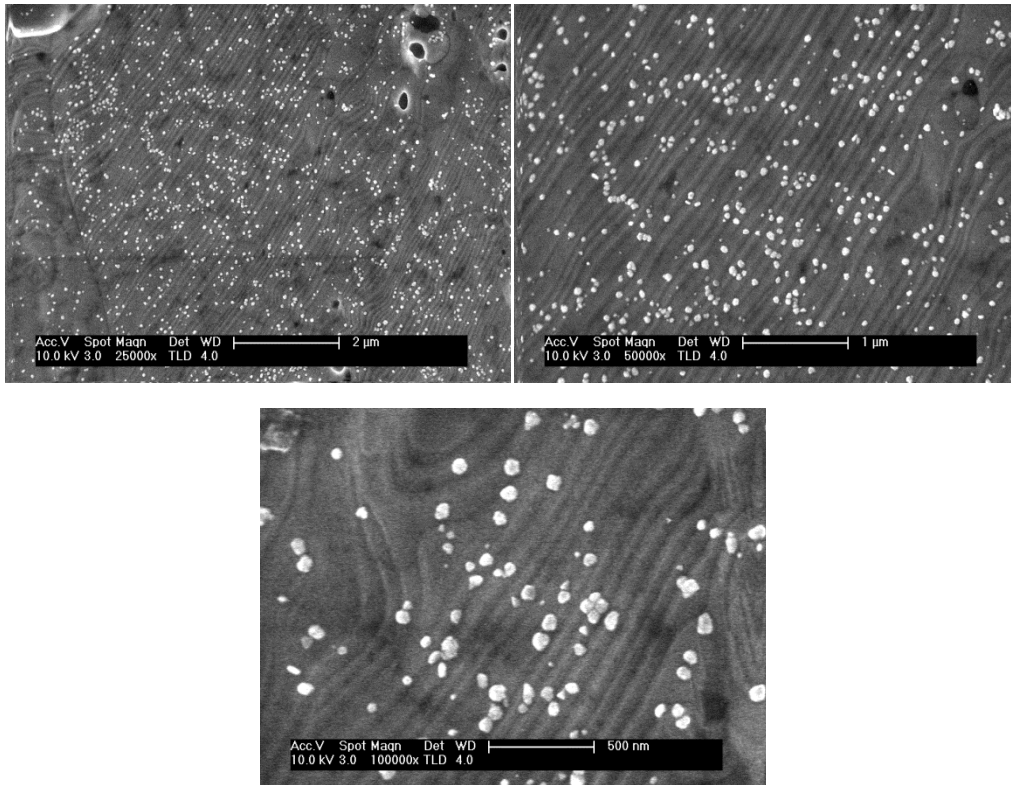
HRSEM micrographs of platinum wire electrodes modified with AuNPs-AMN1



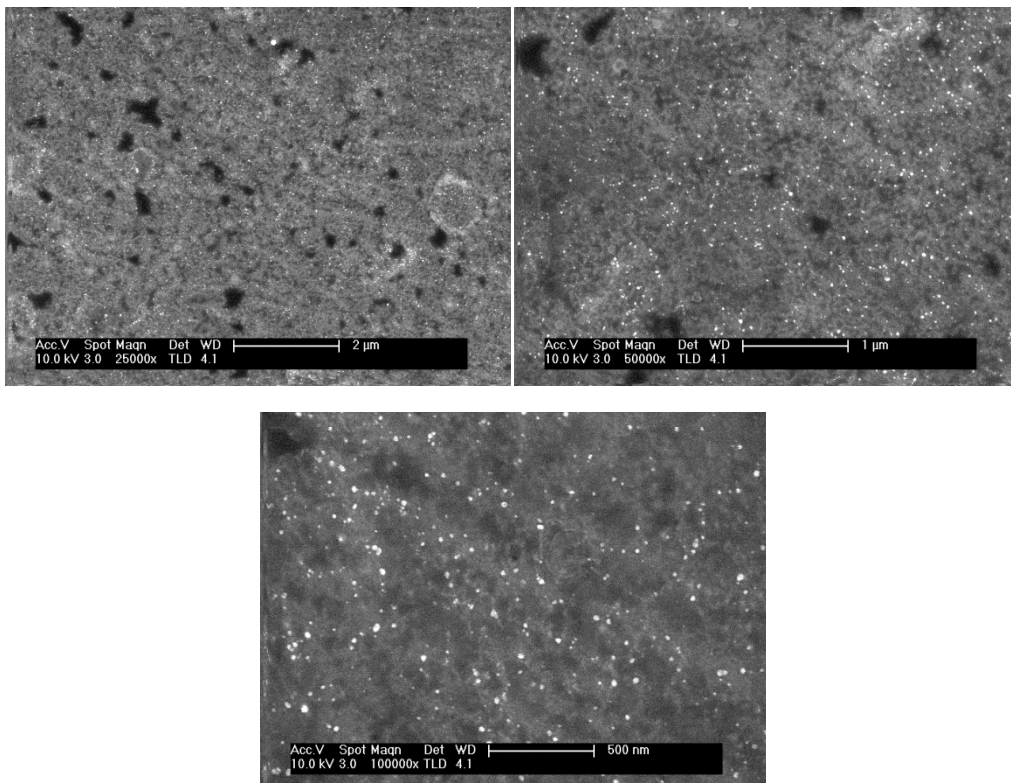
HRSEM micrographs of platinum wire electrodes modified with AuNPs-AMN5.



HRSEM micrographs of platinum wire electrodes modified with AuNPs-AMD1.



HRSEM micrographs of platinum wire electrodes modified with AuNPs-AMD3.



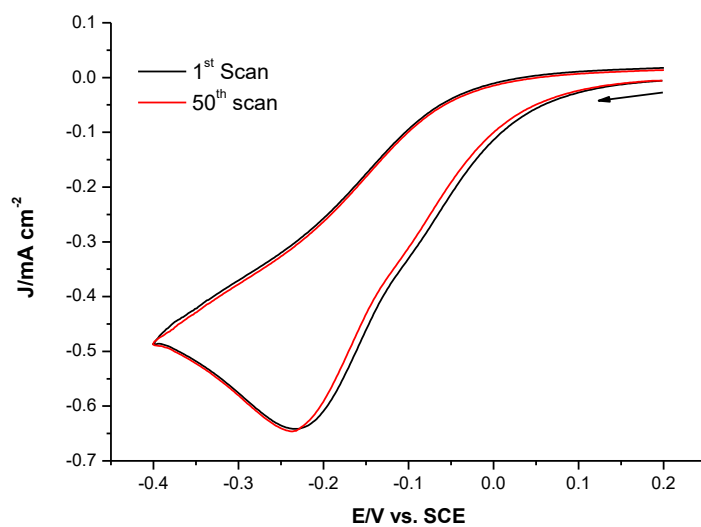
HRSEM micrographs of platinum wire electrodes modified with AuNPs-AMD5.

Kinetic and Statistic data of the ORR Koutecky-Levich study

Electrode	E (V)	Linear fit	R ²	<i>k</i> (s ⁻¹ cm)	<i>n</i>
	-0.09	-10.896(±0.015)-72.720(±7.86)x	0.9991	0,0070±0.0007	2.03
	-0.10	-10.808(±0.012)-69.312(±6.15)x	0.9971	0,0062±0.0006	
	-0.11	-10.765(±0.007)-63.680(±3.33)x	0.9985	0,0057±0.0003	
	-0.12	-10.803(±0.001)-58.127(±0.56)x	0.9975	0,0052±0.0001	
	-0.13	-10.400(±0.012)-56.295(±5.59)x	0.9975	0,0052±0.0001	
	-0.14	-11.447(±0.010)-46.233(±5.39)x	0.9741	0,0039±0.0005	
	-0.15	-11.203(±0.012)-42.917(±6.15)x	0.9698	0.0037±0.0006	
	-0.18	-10.359(±0.005)-33.118(±2.31)x	0.9935	0,0031±0.0002	4.08
AMN1	-0.22	-8.836(±0.001)-29.135(±0.33)x	0.9931	0,0032±0.0001	
	-0.26	-6.939(±0.005)-23.488(±2.51)x	0.9909	0,0040±0.0004	
	-0.30	-4.773(±0.002)-26.064(±1.22)x	0.9933	0,0058±0.0002	
	-0.35	-3.475(±0.002)-26.751(±0.88)x	0.9955	0,0080±0.0002	
	-0.40	-2.057(±0.001)-27.883(±0.59)x	1	0,0104±0.0002	
	-0.45	-2.057(±0.001)-27.882(±0.31)x	0.9994	0,0134±0.0001	
	-0.50	-1.626(±0.001)-28.567(±0.03)x	0.9996	0,0170±0.0001	
	-0.55	-1.378(±0.001)-28.689(±0.09)x	0.9994	0,0200±0.0001	
	-0.60	-1.123(±0.001)-29.165(±0.33)x	0.9994	0,0246±0.0003	

	-0.11	-9.928(±0.014)-71.622(±7.30)x	0.9982	0,0070±0.0007	
	-0.12	-9.887(±0.006)-62.977(±2.98)x	0.9997	0,0062±0.0003	
	-0.13	-8.742(±0.002)-58.858(±0.92)x	0.9957	0,0065±0.0001	1.90
	-0.14	-7.631(±0.001)-56.184(±0.41)x	0.9977	0,0069±0.0002	
	-0.15	-6.499(±0.003)-54.019(±1.50)x	0.9981	0,0081±0.0002	
	-0.22	-3.844(±0.005)-34.039(±2.77)x	0.9971	0,0086±0.0007	
Au-AMN1	-0.30	-2.148(±0.001)-29.805(±0.65)x	0.9997	0,0135±0.0003	
	-0.35	-1.790(±0.001)-29.007(±0.25)x	1	0,0147±0.0001	
	-0.40	-1.431(±0.001)-29.686(±0.59)x	0.9997	0,0201±0.0004	3.94
	-0.45	-1.442(±0.001)-28.756(±0.12)x	0.9998	0,0193±0.0001	
	-0.50	-1.475(±0.001)-27.918(±0.29)x	0.9996	0,0184±0.0002	
	-0.55	-1.299(±0.001)-28.174(±0.17)x	1	0,0210±0.0001	
	-0.60	-1.210(±0.001)-27.802(±0.35)x	0.9999	0,0223±0.0003	

Average of ten measurements with five electrodes.



First and fiftieth cyclic voltammograms of an AuAMN5 modified electrode ($\Gamma=6.8 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm⁻²) in an oxygen saturated ($1.3437 \cdot 10^{-6}$ mol cm⁻³) PBS solution. Scan rate 20 mV s⁻¹.

ARTÍCULO 4

Size-controlled gold nanoparticles
obtained from electrodeposited
amidoferrocenylpoly(propyleneimine)
dendrimer-templates for the
electrochemical sensing of dopamine



Full Length Article

Size-controlled gold nanoparticles obtained from electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimer-templates for the electrochemical sensing of dopamine



Carlos Villena^a, Marta Bravo^a, Beatriz Alonso^b, Carmen M. Casado^b, José Losada^a, M. Pilar García Armada^{a,*}

^a Department of Industrial Chemical Engineering, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Madrid, José Gutiérrez Abascal, 2, Madrid 28006, Spain

^b Department of Inorganic Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2017
Received in revised form 9 May 2017
Accepted 11 May 2017
Available online 26 May 2017

Keywords:

Tailored gold nanoparticles
Ferrocenyl DAB dendrimers
Electrochemical deposition
Electrocatalysis
Dopamine

ABSTRACT

Nanometer-scale gold particles exhibit size-dependent electronic properties with important sensing and biosensing applications. In the same way, a lot of analytes show some type of surface-sensitive reaction and the electrode material has a strong influence on the catalytic activity. In this work we study the kinetics and electrochemistry of electrodes with size controlled gold nanoparticles, obtained by electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimers of two generations as templates, and the kinetics and the analytical response to the oxidation of dopamine. We demonstrate that the four-types of modified electrodes show good catalytic responses toward the oxidation of dopamine *via* different processes in relation with the absence or presence of gold nanoparticles and their size. The best response was obtained with the largest nanoparticles, obtained with the first generation dendrimer-template at 0.3 V vs. SCE, with three linear ranges (0–70, 70–600 and 600–1000 μM), with sensitivities 585.7; 466.0 and 314.3 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$, and limit of detection of 0.01 μM . The effect of interfering substances has been studied by differential pulse voltammetry and the developed sensor has been successfully used for the determination of dopamine in a commercial dopamine hydrochloride injection and in spiked Human urine.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The achievement of gold nanoparticles (AuNPs) with specific size and morphology is still the focus of a lot of researchers because of their size-dependent properties and potential applications in several fields as the electronics, optics, catalysis, etc. At present, numerous methods are used to obtain AuNPs, such as electrochemical [1,2], chemical [3,4] and others [5,6]. In relation with the chemical methods, recently synthetic routes using several protectors have been designed in order to avoid the nanoparticle agglomeration and there exists a great interest in the design of macromolecular architectures for the template synthesis of AuNPs with controlled size to be further used in catalysis [7,8] and sensor devices [9]. Dendritic macromolecules (dendrimers) are particularly interesting as templates because they allow to combine their physical and chemical properties with tunable solubility and sur-

face reactivity. The incorporation of organometallic entities on the surface or within dendritic structures provides a unique opportunity for tailoring organometallic dendrimers to achieve desirable properties for well-defined applications [10,11]. In fact, dendrimers containing redox-active units show interesting electrical and redox properties and have found practical applications such as catalysts, electron transfer mediators, molecular sensors, and electronic devices [12,13]. The nanoparticles size can be controlled by the dendrimer structure and size, and the means by which the metal ions are coordinated into the dendrimer [14]. In the last twenty years we have investigated redox-active organometallic silicon and nitrogen-based dendritic materials containing ferrocenyl groups [15–18] and their applications to the determination of molecules with biological interest [19,20]. A key feature concerning the ferrocenyl dendrimers is their ability to modify electrodes. They can be deposited onto different electrode surfaces, resulting in electroactive material that exhibits high mechanical stability and remains persistently attached to the electrode surface in aqueous media.

In a recent paper [21] we have reported the preparation and a catalytic application of electrodes modified with

* Corresponding author.

E-mail address: pilar.garcia.armada@upm.es (M.P. García Armada).

size-controlled AuNPs synthesized *in situ* on aminoferrocenyl and amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimers previously electrodeposited onto electrode surfaces.

Dopamine (DA) is a significant chemical neurotransmitter extensively distributed in the mammalian central nerve system [22,23], and has an important role in human metabolism. An abnormal level of DA in the brain causes several diseases as depression, stress, mental exhaustion, low sex drive and low motivation [24]. In addition, DA also affects to the function of central nervous, renal hormonal and cardiovascular systems [25–27]. It is involved in drugs addictions and its deficiency can be related to several neurodegenerative diseases such as schizophrenia, Parkinson's or Alzheimer's diseases, and HIV infection [28–32]. Various analytical methodologies have been developed to detect DA however, the most straightforward, rapid, and cost-effective is the use of electrochemical sensing techniques. The electrochemical sensors have other advantages such as high sensitivity, controllability and real-time detection [23].

The major factor that hampers the electrochemical evaluation of DA is the interference of ascorbic acid and uric acid that generally coexist with DA in biological samples and have similar oxidation potential to DA at conventional working electrodes [33]. Therefore it seems necessary to search for sensor electrodes with which these interferences do not hinder the determination of DA. Inorganic-organic nanocomposites have been given much attention for their properties and applications. The unique size-dependent properties exhibited by the AuNPs make it interesting to fabricate modified electrodes for DA determination with enhanced sensitivity, selectivity and reproducibility. In the last years, several contributions have been made in this sense and DA sensors based on AuNPs obtained with different polymers [24,33–41], graphene [42,43], in self-assembled monolayers [44,45], and other more complexes composites [35,46,47] have been reported. However, due to the diversity of NPs sizes, DA-polymer interactions and/or possible synergy of gold-based nanocomposites, a good understanding about the properties of AuNPs, the interaction between AuNPs and the analyte molecules and the mechanisms of detection must be still achieved [24]. In the present article we report the kinetic characterization of electrodes modified with the first and fifth generations of amidoferrocenylpolypropyleneimine (AMD) dendrimers and with the inter- and intra-dendrimer AuNPs with diameters from <2 nm to 60 nm, synthesized from the corresponding dendrimer frameworks electrodeposited onto the electrode surfaces. In the same way, we discuss the mechanism of DA detection and the influence of the AuNPs size in the DA oxidation kinetics and determination.

2. Experimental

2.1. Materials

In this work we have used two amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimers with four (AMD1) and sixty-four (AMD5) amidoferrocenyl units (chart S1), synthesized as previously described [48]. Dichloromethane and other organic solvents were purchased from Sigma. $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ was obtained from Aldrich. TBAH (tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate) was purchased from Fluka. All other chemicals were analytical grade and were used without further purification. Ultrapure water was used for preparation of buffers and standards, and for electrochemistry solutions.

2.2. Measurements

Electrochemical measurements were performed with an Ecochemie BV Autolab PGSTAT 12 instrument. The experiments were

performed in a conventional three-electrode cell at 20–21 °C with a Pt disk of 3 mm diameter as a working electrode, a Pt wire as an auxiliary electrode, and a BAS nonaqueous Ag/Ag^+ reference electrode or a saturated calomel reference electrode (SCE) were employed in organic solvents or in aqueous media, respectively. In steady-state measurements, an Autolab rotating disk electrode was used and the amperometric measurements were performed in 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 with 0.1 M NaClO_4 (PBS) as supporting electrolyte. For the DA determination, all solutions were deoxygenated by bubbling high-purity nitrogen through them for at least 15 min. The background current was allowed to decay to a steady value before aliquots of DA were added. A Biologic VMP3 multichannel potentiostat-galvanostat (Biologic, France) coupled with EC-Lab v10.44 software was used for the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) characterization of electrodes. EIS measurements were performed in 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) containing 0.1 M KCl with 10 mV AC perturbation and frequency range 100 kHz–10 mHz. The scanning electron microscope images were recorded on an ultra-high resolution scanning electron microscope Philips XL30S FEG.

2.3. Electrodes preparation

The modified Au-AMD electrodes were obtained as described previously [21]. Briefly, Pt disk electrodes were polished with 0.1 μm alumina powder, rinsed with water in an ultrasonic bath and conditioned by cycling the potential between the limits for hydrogen and oxygen evolution in H_2SO_4 solution (0.5 M) until well-defined cyclic voltammograms were obtained. All the two generations dendrimer films were electrodeposited under potentiostatic control at +1.0V (vs. Ag/Ag^+) from the electrolyte bath containing the redox active species (ferrocene, 1 mM) and TBAH (0.1 M) in dichloromethane deaerated with nitrogen. The coated electrodes were rinsed with dichloromethane and water. In all cases the surface coverages of electroactive ferrocenyl sites in the films, Γ , were determined from the integrated charge, Q , of the cyclic voltammetric waves. The dendrimer modified electrodes, AMD1 and AMD5, were stored at room temperature when not in use.

To obtain the AuNPs with average sizes of 60 and <2 nm [21], the corresponding AMD1 and AMD5 modified electrodes were dipped in a stirred HAuCl_4 0.1 mM solution for 10 min and then rinsed with ultrapure water to remove the uncoordinated ions. Next, the electrodes were dipped in a stirred NaBH_4 0.1 mM in NaOH 0.3 M during 10 min to reduce the Au ions and form the NPs. The modified electrodes were rinsed with ultrapure water.

3. Results and discussion

3.1. Electrochemical and kinetic characterization of modified electrodes

The morphology of electrodes modified with the two generations of dendrimers with and without AuNPs (Fig. 1), and the electrochemistry and kinetic behavior of the AMD1 and AMD5 films were studied earlier [20,21]. Briefly, the AMD1 and AMD5 modified electrodes show reversible systems with $E^\circ = 0.517$ and 0.503 V vs. SCE respectively [20].

The Au-dendrimer films present an electrochemical behavior very similar to those of dendrimer films. In the same way that the AMD films, the electrochemical behavior of Au-dendrimer electrodes at several scan rates, presented cathodic and anodic peaks separations (ΔE_p) practically constant, in all cases, at all the scan rates from 0.1 to 5V s^{-1} , indicative of the absence of kinetic limitations [49]. Also, the Au-dendrimer electrodes (Au-AMD1 and

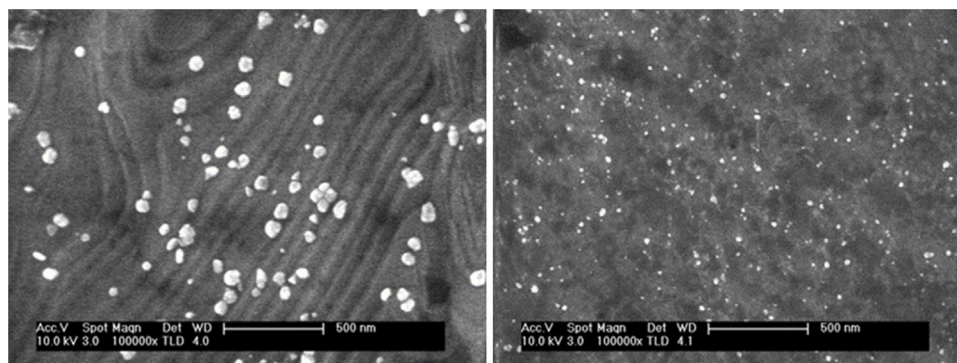


Fig. 1. URSEM micrographs of platinum wires modified with Au-AMD1 (left) and Au-AMD5 (right) films.

Table 1
Electrochemical and kinetic results.

Electrode	$^a E^{0'}$ (V vs. SCE)	$^a \Delta E_p$ (V)	$^a W_{1/2}$ at 2 V s^{-1} (mV)	D_{ct} ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) ($\Gamma \cong 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)
Au-AMD1	0.49	0.060 ± 0.006	121	$2.2 \cdot 10^{-9}$
Au-AMD5	0.49	0.080 ± 0.005	101	$0.6 \cdot 10^{-9}$

^a Average of six electrodes.

Au-AMD5) show ΔE_p higher than zero (see Table 1), but slightly higher than those of dendrimer electrodes, probably due to their non-planar heterogeneous surface. The formal potential, $E^{0'}$, calculated from the anodic and cathodic peak potentials are lower than those of the dendrimer-electrodes. This fact is indicative of the better conductivity of the Au-AMD electrodes.

Fig. 2a and b show the plots of the anodic and cathodic peak currents vs. the scan rate, ν , for the two generations of Au-AMD electrodes. These plots show linear relationship due to the surface confined nature of the electroactive groups, as theoretically predicted for a surface-immobilized couple. In addition, the increase of the charge, Q , as ν decreases is observed too, which confirms the multilayer structure of the dendrimer film and the existence of certain charge percolation [50,51]. Consequently, the Au-AMD films show fast kinetics and electron-transfer with the electrode also fast [20]. A very successful approach for the interpretation of this problem is based on the fact that the speed of electrons, and the corresponding balancing counter ions transport through the multilayer films, obeys the diffusion laws with a called diffusion coefficient of charge transport, apparent or effective diffusion coefficient. Some cases have been reported in which a change in the linear dependency of i_p from ν to $\nu^{1/2}$ is observed [20,51] from certain scan rate values. This change is attributed to the interaction between the scan rate and the charge transfer kinetics through the film. When the current of the voltammetric peak is proportional to $\nu^{1/2}$, the speed of electrons and the corresponding balancing counter ions transport through the multilayer films obeys the diffusion laws, and it can be expressed by the same equation used for species in solution (Randles-Sevcik) [51]:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D_{ct}^{1/2} C_0 \nu^{1/2}$$

where D_{ct} is the called diffusion coefficient of charge transport, effective or apparent diffusion coefficient and C_0 is the concentration (mol cm^{-3}) of active sites in the film. D_{ct} can be obtained from the slopes of the $i_p - \nu^{1/2}$ plots once C_0 is known. In our case, a change in the linear dependency of i_p from ν to $\nu^{1/2}$ was observed for the films of both generations (Fig. 2c) and C_0 was calculated from the integrated area below the voltammetric peak and the depth of the dendrimer coverage obtained by Atomic Force Microscopy measurements [21]. The obtained values for Au-AMD1 and Au-AMD5 films were $8.18 \cdot 10^{-5}$ and $1.81 \cdot 10^{-4} \text{ mol Fc cm}^{-3}$ respectively. Table 1 shows the D_{ct} average values for each one

of the modified electrodes. The Au-AMD electrodes show apparent diffusion coefficients notably increased in comparison with those obtained with AMD1 and AMD5 modified electrodes ($2.1 \cdot 10^{-11}$ and $0.5 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectively) [20]. This increase in the speed of electrons transport through the multilayer films is obviously due to the presence of AuNPs.

The electronic transfer coefficients, α , were estimated from the width at mid-height $W_{1/2}$. For very high scan rates, the $W_{1/2}$ of the cathodic peak is equal to $62.5/\alpha$ mV and for the anodic peak to $62.5/(1-\alpha)$ when only one electron is transferred [52]. The $W_{1/2}$ values obtained (Table 1) for the anodic and cathodic peaks were equal, indicating that $\alpha = 0.5$, as those observed for the dendrimer electrodes [20].

To determine the conductivity of the modified electrodes, the impedance behavior of the different modified electrodes was studied. Fig. 3 displays the results of impedance spectrum on bare and AMD1 and Au-AMD1 modified electrodes. The charge transfer resistance, R_{ct} , of the electrode is equal to the diameter of semicircle appearing in the Nyquist plot. When the dendrimer film is deposited onto the electrode, an increase in the semicircle diameter was observed due to the lower conductivity of the ferrocenyl-dendrimer films. However, after formation of AuNPs, a remarkable decrease of the R_{ct} is observed owing to the good conductivity of the nanoparticles. These results indicate that the AuNPs enhance the electron transfer efficiency of the composites.

3.2. Electrooxidation of DA on the dendrimer-electrodes

The ferrocenyl dendrimers are themselves good electrocatalysts for numerous analytes. Therefore, we have previously studied the electrochemical oxidation behavior of DA at the dendrimer-electrodes in order to investigate the influence of the AuNPs and their sizes on the DA oxidation. Fig. 4a displays the cyclic voltammograms at bare (inset) and AMD1 and AMD5 modified electrodes (curves D and C respectively) in presence of 0.5 mM DA, in PBS supporting electrolyte. The process detected in the cyclic voltammograms C and D shows a quasi-reversible electrochemical behavior corresponding to the oxidation of DA to dopamine-o-quinone. The ratio i_{pc}/i_{pa} indicates the presence of a coupled chemical reaction. Some authors have proposed that dopamine-quinone can form leucodopachrome by intermolecular cyclization and/or aminochrome by deprotonation [53,54]. Then,

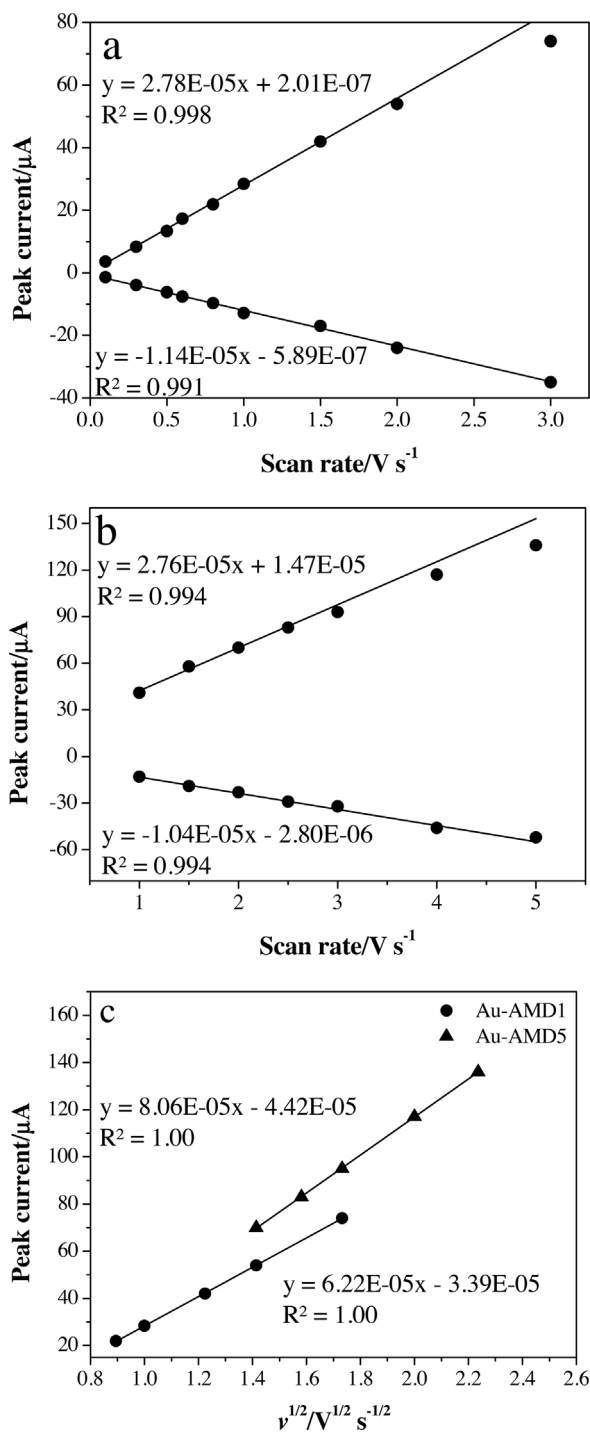


Fig. 2. (a) Plot of the peak currents vs. the scan rate obtained for Au-AMD1, (b) for Au-AMD5 and (c) plot of the peak currents vs. the square root of scan rate obtained for Au-AMD1 and Au-AMD5, all in PBS pH 7.0.

leucodopachrome is oxidized to dopaminochrome, which may be subsequently transformed into melanin polymers. In a wider electrochemical measurements range (Fig. S1, Supporting information), a new system is observed at more cathodic potentials, which can be attributed to redox couple leucodopachrome/dopaminochrome [44], thus confirming the formation of leucodopachrome.

The peak current values are substantially higher than those obtained with the uncoated surface (inset in Fig. 4a), thus offering a much higher oxidation response over the 0.05–0.3 V range. The i_{pa} is directly proportional to the square root of potential scan rate,

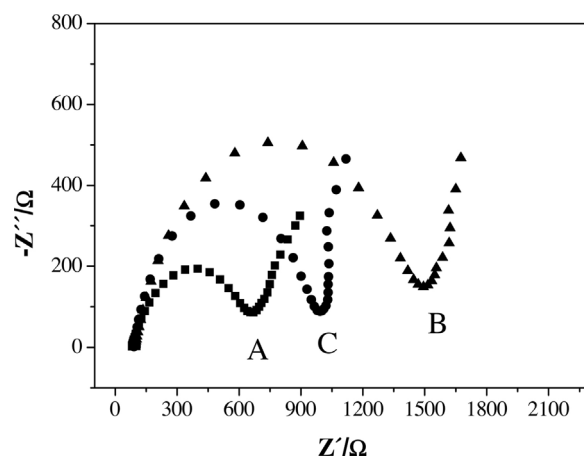


Fig. 3. Electrochemical impedance diagrams of the (A) unmodified Pt electrode, (B) AMD1 and (C) AuNPs-AMD1 modified electrodes in a $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution.

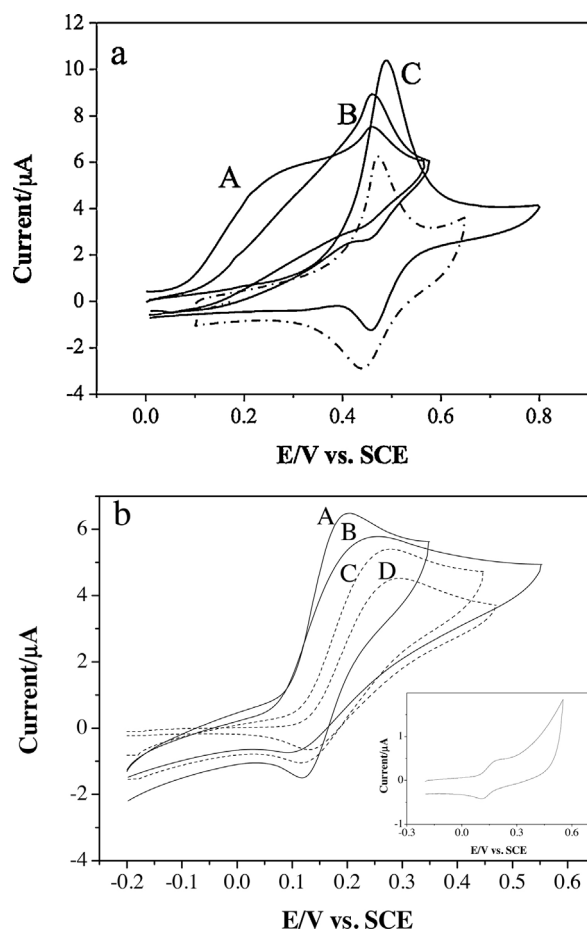
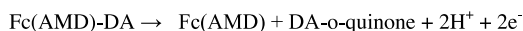
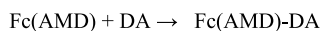
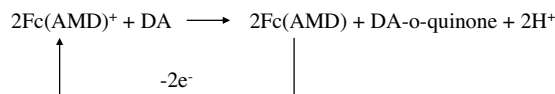


Fig. 4. (a) CVs obtained for (A) Au-AMD1 ($1.5 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}), (B) Au-AMD5 ($1.2 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}), (C) AMD5 ($\Gamma = 1.9 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) and (D) AMD1 ($\Gamma = 2.2 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) modified electrodes in PBS pH 7 at scan rate of 10 mV s^{-1} . (b) CVs obtained for several AMD5 modified electrodes in presence of DA 0.5 mM with dendrimer coverages (A) $2.1 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2} ; (B) $3.5 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2} and (C) $1.03 \cdot 10^{-8}$ mol Fc cm^{-2} . Dashed line shows the CV of AMD5 electrode with $2.1 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2} in absence of DA. All in PBS pH 7 at scan rate of 5 mV s^{-1} . Inset: voltammetric signal of DA 0.5 mM with an unmodified Pt bare electrode in the same conditions.



Scheme 1.



Scheme 2.

$\nu^{1/2}$, over the range of 10–300 mV s⁻¹. These results indicate that the overall electrochemical reaction of DA at the modified electrodes might be controlled by the diffusion of DA as well as by a kinetic process. The peak oxidation potentials shift to more positive values with increasing scan rate and there is a linear correlation between the peak potential and the logarithm of the scan rate. The transfer coefficient α and the number of electrons involved in the rate-determining step, n_α , can be evaluated from the slope of E_p with $\log \nu$, using the equation valid for an irreversible diffusion controlled process:

$$E_p = (b/2)\log \nu + \text{constant}$$

where **b** is the Tafel slope, $(2.3RT)/(1-\alpha)n_\alpha F$ [55]. Assuming α equal to 0.5, the values of n_α were estimated 1.66 and 1.60 for electrodes modified with AMD1 and AMD5 respectively. Then, it seems reasonable to consider that a two electrons transfer process is the rate-determining step of DA oxidation on the modified electrodes with obtained transfer coefficients values, α , 0.55 and 0.6 for the AMD1 and AMD5 electrodes respectively.

On the other hand, Fig. 4b shows that the catalytic wave is not coincident with that of the mediator oxidation itself. These fact has been observed previously in other cases [56,57] and corroborates the formation of an intermediate complex in the catalytic oxidation of DA. This behavior can be explained by the interactions established between DA and the groups of the dendritic macromolecules. It has been proposed [58] that the hydrophobic part of DA could experience a long range hydrophobic interaction with the amide–NH– group of the dendrimer, and the cationic part of DA could form hydrogen bonding with the amide–C=O functional group of other nearby adjacent dendrimer. In agreement with the observed behavior, the mechanism for the catalyzed oxidation of DA can be given by the Scheme 1:

To establish the optimum experimental conditions for sensitive and selective determination of DA the effect of dendrimer film coverage on the electrocatalytic signals was studied. As can be seen from Fig. 4b, with increasing coverage the catalytic current of the DA oxidation decreases and the electrocatalytic wave is poorer developed and practically disappears for thicker films. This behavior could be explained by limitations derived from the inefficient charge propagation through the film that hampers the electron transfer at the surface dendrimer film. Nevertheless, for these thicker films an oxidation peak appears at the same potential than the corresponding to the reversible ferrocene/ferrocenium system confined in the electrode surface. In addition, the presence of DA causes a substantial enhancement in the anodic peak of the ferrocene whereas the cathodic peak current diminishes as expected for a catalytic process. The correlation between the electrode potential for the oxidation of DA and that of the ferrocenyl groups strongly suggests that ferrocene has catalytic activity and acts as mediator for the electrocatalytic oxidation of DA at about +0.45 V. At this potential the ferrocene groups are oxidized and the charge propagation through the film takes place by electron-hopping transport. In the case of the electrodes modified with thick films of the dendrimers the oxidation mechanism of DA can be described as shown in the Scheme 2.

The kinetics of the catalyzed oxidation of DA was investigated at modified rotating-disk electrodes. The linearity of the Levich plots (i_{lim} vs. $\omega^{1/2}$) at low rotation rates indicates mass-transport-limited kinetics. At higher rotation rates, these plots deviate from linearity,

Table 2

Dopamine determination: electrochemical and kinetic results.

Electrode	^a E_p (V vs. SCE)	^a k_{obs} (M ⁻¹ s ⁻¹)	^a D_0 (cm ² s ⁻¹)
AMD1	0.28	2.6·10 ³	1.1·10 ⁻⁵
AMD5	0.25	6.3·10 ³	0.9·10 ⁻⁵
Au-AMD1	0.19	1.1·10 ⁴	1.0·10 ⁻⁵
Au-AMD5	0.24	3.4·10 ³	1.0·10 ⁻⁵

^a Average of five electrodes with dendrimer coverages between 1·10⁻¹⁰ and 4·10⁻⁹ mol Fc cm⁻².

which suggests a kinetic limitation. These data clearly indicate that the limiting currents observed at dendrimer modified electrodes are not entirely transport controlled, but also partially controlled by the catalyzed electron-transfer kinetics. In these cases, the Koutecky-Levich equation [59,60] can be used to obtain the rate constants, k , being $k = k_{obs} \cdot \Gamma$:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{nFAC_0} \left(\frac{1}{k_{obs}\Gamma} - \frac{1}{0.620D_0^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2}} \right)$$

where n denotes the number of electrons, F the Faraday constant, A the electrode area, ν the kinematic viscosity, D_0 the diffusion coefficient, Γ is the coverage (the sum of both the oxidized and reduced form of the bound mediator at any potential), ω the angular velocity, k_{obs} is the heterogeneous second-order rate constant and C_0 the bulk concentration of DA. The diffusion coefficient, D_0 , can be evaluated from the slope of the Koutecky–Levich plots (i^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$) (Fig. 5a), knowing the number of electrons participating in the reaction ($n=2$ in this case). The heterogeneous rate constant, k_{obs} , can also be evaluated from the intercept, knowing the dendrimer coverage from the integral of the area under the voltammetric waves.

The obtained values of k_{obs} were dependent of DA concentration, as revealed in Fig. 5b. This has also been observed for certain electrodes used for the catalytic oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and has been explained by the formation of a charge transfer complex previously to products formation [61]. The obtained diffusion coefficients for both dendrimer electrodes are summarized in Table 2. Plots of $1/k_{obs}$ versus [DA] (Fig. 5c) showed linear relationships in all the cases, supporting the formation of the charge transfer complex mediator-DA. The $k_{obs,[DA]=0}$ values were evaluated for the AMD1 and AMD5 modified electrodes and are also collected in Table 2.

3.3. Electrooxidation of DA on the Au-AMD-electrodes

Fig. 4a also shows the electrochemical oxidation of DA at the Au-AMD1 and Au-AMD5 electrodes (curves A and B). From the comparison with the corresponding bare, AMD1 and AMD5 electrode curves (inset, D and C), we can observe that the presence of AuNPs shifts cathodically the DA oxidation peak (see also Table 2), particularly for the Au-AMD1. The anodic peak currents become higher than those obtained with the respective dendrimer electrodes and the cathodic peaks increase, indicating an increase in the reversibility. This behavior is indicative of a more efficient electrocatalytic activity in the electrodes modified with AuNPs. Moreover, the cyclic voltammograms recorded in presence of DA do not show the same behavior changes with the increasing dendrimer coverage thickness than those of the dendrimer electrodes. This fact indicates that the reaction of DA oxidation occurs at the AuNPs surface instead

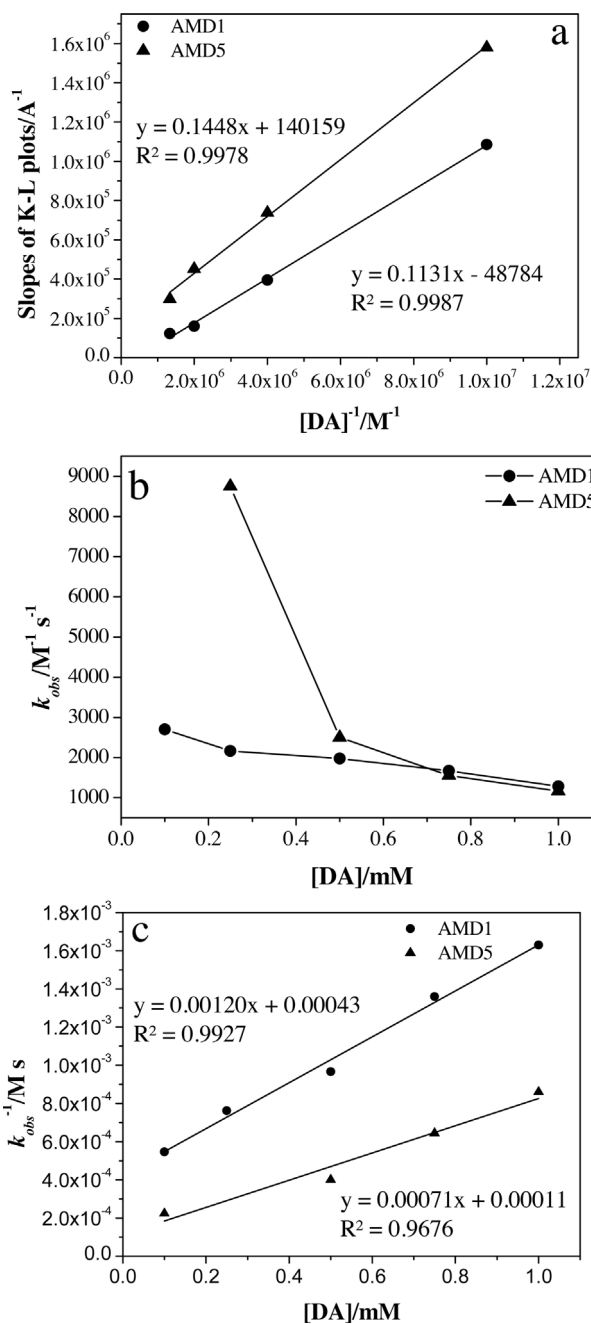


Fig. 5. (a) Slopes of Koutecky-Levich plots vs. $[DA]^{-1}$ shown for the AMD1 ($2.8 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) and AMD5 ($1.3 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) modified electrodes; (b) variation of k_{obs} with $[DA]$ for the AMD1 ($1.0 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}), and AMD5 ($2.8 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}); and (c) variation of k_{obs}^{-1} obtained for the AMD1 ($2.8 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) and AMD5 ($1.3 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) modified electrodes with the dopamine concentration. All measurements were in PBS pH 7.0.

of at the dendrimer and is independent of the thickness of the dendrimer films. Cyclic voltammograms recorded with electrodes of various coverages reveal that the electrochemical behavior of DA electro-oxidation at the Au-AMD electrodes is independent of the films thickness in the range of coverages from $1.0 \cdot 10^{-10}$ to $5.0 \cdot 10^{-9}$ mol Fc/ cm^2 .

The effect of the scan rate in presence of DA was examined for the Au-AMD electrodes and the same linear response than for the AMD electrodes was observed, indicative of a typical diffusion-controlled electrode kinetics (Fig. 6).

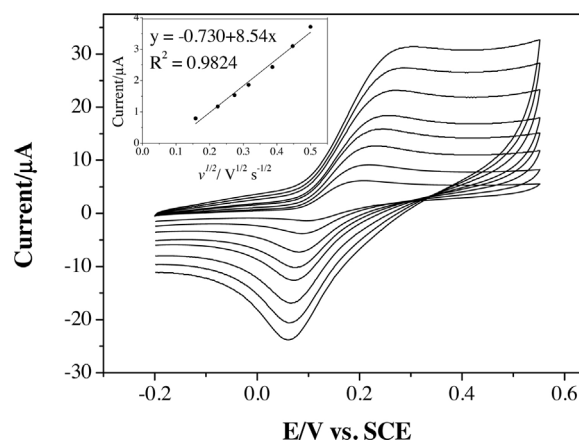


Fig. 6. CVs obtained for an Au-AMD1 ($1.82 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) in presence of DA 0.5 mM at scan rates 10, 25, 50, 100, 150, 200 and 250 $mV s^{-1}$ in PBS pH 7. Inset: Peak currents vs. the square root of scan rate.

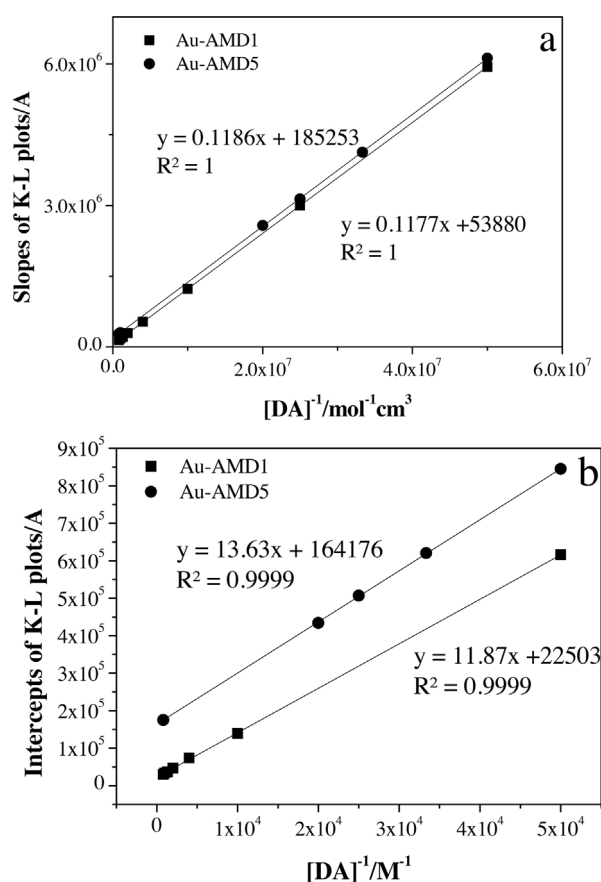


Fig. 7. (a) Slopes of Koutecky-Levich plots vs. $[DA]^{-1}$ shown for the Au-AMD1 ($6.3 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) and Au-AMD5 ($1.6 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}) modified electrodes; (b) intercepts of Koutecky-Levich plots for the same electrodes. All measurements were in PBS pH 7.0.

The diffusion coefficients (D_0) were calculated from both Randles-Sevcik equation and Koutecky–Levich slopes (Fig. 7a) for several DA concentrations. The D_0 values (Table 2) obtained by both methods were coincident and similar to those of them dendrimer electrodes. The number of electrons calculated by feedback of these methods were close to 2 in all cases, clearly demonstrating that the electrocatalytic oxidation of DA on the Au-AMD modified electrodes is a two-electron transfer process. The rate constants (k_{obs}) estimated from the intercepts of the Koutecky–Levich plots (Fig. 7b)

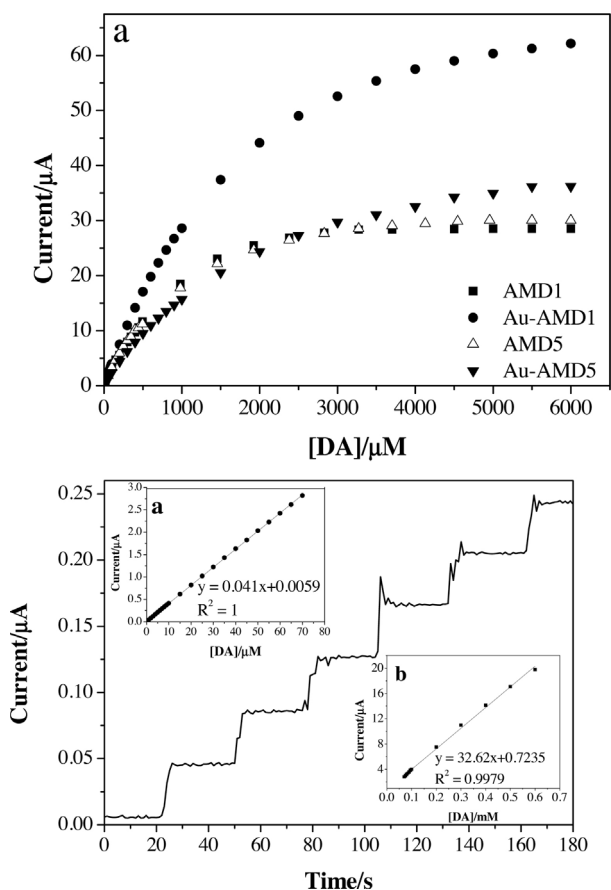


Fig. 8. (a) Plots of chronoamperometric currents vs. DA concentration of rotating AMD1 ($1.3 \cdot 10^{-9}$ mol Fc cm^{-2}), AMD5 ($6.8 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}), Au-AMD1 ($7.5 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) and Au-AMD5 ($3.4 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) modified electrodes. (b) Response of an Au-AMD1 modified electrode ($7.0 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) to successive additions of $1 \mu\text{M}$ of DA. Insets: (a) First and (b) second linear ranges of the calibration plot obtained with Au-AMD1. All measurements were at 0.3 V vs. SCE in PBS pH 7.0 and 500 rpm.

are collected in Table 2. For the Au-AMD electrodes, the k_{obs} are independent of DA concentration indicating a change in the DA oxidation site, in relation to the AMD electrodes. Now, the oxidation takes place on the AuNPs surface and the ferrocene complex formation is not significant or does not occur. Any change in the DA oxidation pathway related with the oxidation site was found.

As it can be seen, the Au-AMD1 electrode, with larger AuNPs, exhibits a greater k_{obs} and a lower peak potential than Au-AMD5 and seems to be the more advantageous device.

3.4. Electrochemical determination of DA

The determination of DA was carried out by Amperometry and Differential pulse voltammetry. The amperometric responses to DA of both dendrimer and Au-AMD modified electrodes were determined at several applied potentials and the results are collected in Table 3. Fig. 8a shows the calibration plots of the four modified electrodes to successive additions of DA at 0.3 V vs. SCE applied potential.

As can be seen, and in accordance with the obtained heterogeneous second-order rate constants, k_{obs} , the Au-AMD1 electrodes show the best response and the Au-AMD5 electrodes only show some advantages at low potentials in relation to the AMD5 electrodes. As expected, the amperometric signals confirm the behavior predicted in the kinetic study, demonstrating that the DA oxidation is favored on the larger AuNPs obtained with the AMD1 template,

showing a wider linear range, a competitive sensibility and the lowest detection limits. The smaller AuNPs, although prevail on the ferrocene because of their faster kinetics, offer poor sensitivity and worse analytical parameters towards the DA oxidation. In relation with the applied potential, note that solely the Au-AMD1 electrodes show three linear ranges at 0.3 V which has been observed by other authors [33,47], and suppose a considerable increase in the application possibilities of this sensor, especially taking into account the simplicity of this electrode in comparison with other proposed dopamine electrochemical sensors (Table S1, Supporting information). Consequently, 0.3 V was considered as optimal working potential for the amperometric determinations.

The amperometric responses to successive additions of DA and the corresponding calibration curve for the Au-AMD1 modified electrode at 0.3 V vs. SCE are shown in Figs. 8 b and S2 (Supporting information). As can be seen, the catalytic current increased steeply and reached a stable value within 5 s upon the addition of DA.

Differential pulse voltammetry (DPV) is widely used in real samples because it offers a peak resolution enough to make simultaneous determinations or avoid common interferences. For this reason, the determination of DA by DPV using the Au-AMD1 electrode was studied. Fig. S3 (Supporting information) shows the differential pulse voltammograms at various concentrations of DA and two of the calibrate plots obtained for several concentration intervals. The peak potential of DA appears at about 0.15 V vs. SCE and the anodic peak current i_{pa} was proportional to the concentration of DA in the range from 0.5 to $120 \mu\text{M}$ with an average ($n = 4$) linear regression equation: $i_{pa}(\mu\text{A}) = 0,0044 (\pm 0,0008) + 0,0243 (\pm 0,0003) \cdot C_{DA} (\mu\text{M})$ with the average correlation $0,9950 (\pm 0,0040)$. The detection limit (as three times the standard deviation) was $0,06 \mu\text{M}$. The relative standard deviation of 10 successive scans was $1,4\%$ for $1,0 \mu\text{M}$ DA. These experimental results indicate that the Au-AMD1 electrode possess excellent characteristics as DA sensor.

3.5. Interference, reproducibility and stability studies

In physiologic samples, DA usually coexists with other electroactive species as ascorbic acid (AA), glucose, tryptophan, acetaminophen or uric acid (UA). We have selected the physiological pH 7.0, which is the most frequently used. However, some authors have preferred other pH values due to the effect caused on the peak potentials and resolution of them. On the one hand, the reactions of oxidation of AA, DA and UA involve a deprotonation step, facilitated at higher pH values and, on the other hand, the charge of analytes changes with the pH depending on each corresponding pKa (DA: 8.87; AA: 4.10; and UA: 5.7) [62]. When the modified electrode charge changes with the pH, the use of other pH value can promote the electrostatic interaction with some analytes to obtain the maximum peak separation [63,64]. In our case, the ferrocene charge does not depend on the pH, but on the applied potential and, at the working potential, the ferrocene remains neutral. Therefore, electrostatic interactions between the cationic DAH^+ or the anionic AA and UA and the electrode do not occur. Due to their oxidation peak potentials, only AA and UA could cause interferences in the DA determination at the Au-AMD1 electrode. Consequently, the interfering effects of AA and UA were examined by simultaneous measurements of AA, DA, and UA.

Figs. S3–S5 (Supporting information) show the DPV voltammograms of DA, AA and UA respectively. Note that the determination of AA and UA would be also possible, although their sensitivities (55.86 and $12.19 \mu\text{A}/\text{mM cm}^{-2}$ respectively) are significantly lower than those of DA ($651.7 \mu\text{A}/\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, Table S1 and Fig. S3, Supporting information). The peak potentials obtained for AA and UA are 0.24 V and 0.45 V respectively, and the peak potential of DA is 0.16 V vs. SCE, in accordance with the reported literature

Table 3
Amperometric Analysis Results.

Electrode	Γ^a (molFc/cm ²)	E (V vs. SCE)	Γ^a Sensitivity (μ A/mM cm ²)	Γ^a Linear range (μ M)	R ²	$\Gamma^{a,b}$ Detection limit (μ M)
AMD1	$1.1 \cdot 10^{-9}$	0.30	308.6	0–550	0.9928	2.4
AMD5	$9.6 \cdot 10^{-10}$	0.30	304.3	0–550	0.9905	2.7
Au-AMD1	$7.5 \cdot 10^{-10}$	0.30	585.7	0–70	1	0.01
			466.0	70–600	0.9981	
			314.3	600–1000	0.9968	
			345.3	0–400	0.9946	
Au-AMD5	$3.9 \cdot 10^{-10}$	0.25	218.2	0–200	0.9960	0.04
			0.20	0–200	0.9960	
			0.30	0–200	0.9965	
			0.25	0–300	0.9971	
		0.20	72.5	0–200	0.9983	0.8

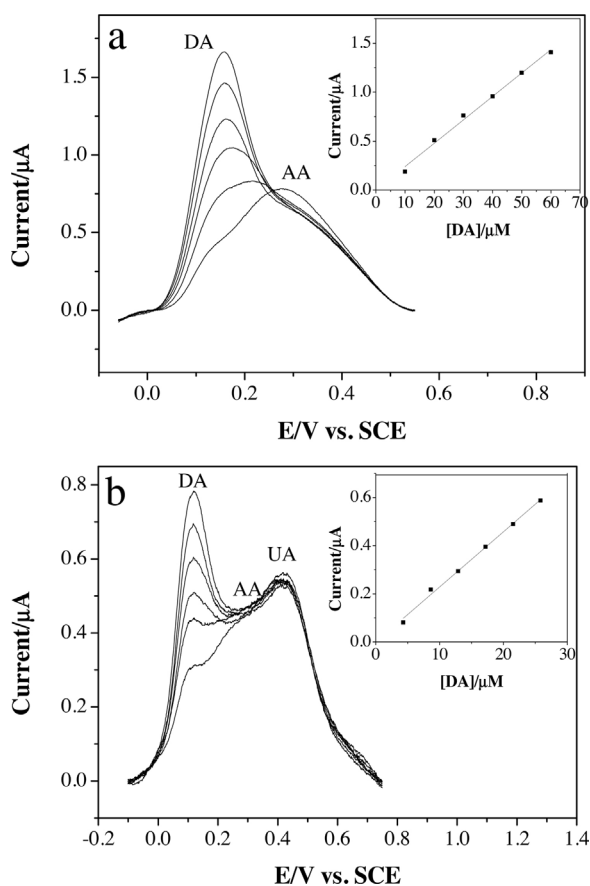
^a Average of five electrodes.^b Calculated as 3 x standard deviation of signal/slope of the calibration line.

Fig. 9. DPVs of the Au-AMD1 modified electrode in PBS pH 7.0 (a) containing 0.2 mM AA and several concentrations of DA (10–60 μ M); (b) containing 0.2 mM AA, 0.2 mM UA and different concentrations of DA (4–26 μ M). Insets: peak current-concentration linear relations of (a) $y = 0.0239 \pm 0.0007 x + 0.0004 \pm 0.0001$; $R^2 = 0.9936 \pm 0.005$; and (b) $y = 0.0229 (\pm 0.0008) x - 0.0002 (\pm 0.0001)$; $R^2 = 0.9956 (\pm 0.003)$.

(see Table S1, Supporting information). In view of the anodic peak potentials separation for DA, AA and UA, we can expect a good resolution between the DA and UA peaks but poor for the DA and AA ones, however, the great difference in their sensitivities is a significant advantage. The resolution of the DA and AA peaks was studied making several additions of DA in presence of AA. Fig. 9a shows the peaks for DA at several concentrations between 10 and 70 μ M, in presence of 0.2 mM AA. As can be seen, the AA peak is slightly shifted to more anodic potential in presence of DA, allowing the DA determination with the same sensitivity than in absence of AA (see the slope of the peak current-concentration plot, inset

Table 4
Determination of DA in real samples (n = 3).

Sample	DA added (μ M)	DA found (μ M)	Recovery (%)	SD
Dopamine hydrochloride injection	33.75	33.78	100.09	0.04
Human urine	5.00	5.00	100.00	0.05

in Fig. 9a). The detection limit is 0.13 μ M, rather higher than that obtained in absence of AA. Next, we investigated the DPV responses of ternary mixtures containing increasing quantities of DA in presence of AA and UA with concentrations 0.2 mM (Fig. 9b). Three well-resolved independent anodic peaks were observed for DA, AA and UA, although the AA peak is notably smaller. The slope (inset in Fig. 9b), and therefore the sensitivity, were also similar to results obtained in absence and presence of AA and the detection limit increases to 0.20 μ M. These results show the usefulness of this sensor to be applied to measure real physiological samples.

The sensitivities of repeated DA determinations remained more than 98.4% of their initial scans after the electrodes were kept in water for two weeks. These results show that the developed electrode exhibits good stability in DA detection and no obvious damage in the Au-AMD structure was observed during the successive scans. Moreover, we also confirmed the long-term stability of the modified electrodes by measuring the peak current of a 10 μ M DA solution with several Au-AMD1 electrodes (n = 3) in five successive measurements within a period of 14 days. The DA responses remained the same at different times. These results indicate that the proposed AuNPs-AMD1 modified electrodes exhibited excellent reproducibility and long-term stability.

3.6. Application in real samples

The Au-AMD1 was used for the detection of DA in spiked human urine and in a commercially acquired dopamine hydrochloride injection sample. The urine samples (22.5 mL) were diluted to 25 mL with PBS pH 7.0 to ensure the pH of samples and then appropriate amounts were transferred to the electrochemical cell. The dopamine injection (10 mg mL⁻¹ DA, 2.0 mL per injection.) was diluted appropriately in 0.1 M phosphate buffer to bring it to the working concentration range. The resultant solutions were placed in the cell and DPV responses were recorded at sensor electrode. The results are shown in Table 4. The appreciable found and recovery results reveal that the Au-AMD1 modified electrode is useful to determine DA in different real samples.

4. Conclusions

New electrochemical sensors based on electrodes modified with size-controlled AuNPs by using two generations of electrodeposited amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimers as templates have been studied to the dopamine determination. The modified electrodes were characterized by electrochemical methods. The kinetic study of Au-AMD electrodes demonstrates that, in the same way that the AMD electrodes, they do not have kinetic limitations. The AMD and Au-AMD developed electrodes showed excellent electrocatalytic behavior toward the dopamine oxidation. The cyclic voltammograms of DA at the AMD electrodes exhibited an irreversible electrochemical behavior with oxidation peaks of 0.28 and 0.24 V vs. SCE for the first and fifth generations respectively, while at the Au-AMD electrodes showed a reversible behavior with oxidation peaks at 0.19 and 0.24 V vs. SCE for the first and fifth generations respectively. The kinetics of electrocatalytic DA oxidation studied by rotating-disc voltammetry demonstrated that electrodes modified with the Au-AMD1, with the larger NPs, are the most efficient. The obtained heterogeneous second-order rate constant values also demonstrate the higher efficiency of Au-AMD1 electrodes in relation with the other modified electrodes. These results are confirmed by the excellent and competitive analytical characteristics of the Au-AMD1 electrodes for the DA determination, which shows three amperometric linear ranges at working potential of 0.3 V vs. SCE: between 0 and 70 μM , with sensitivity 585.7 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ and limit of detection of 0.01 μM , from 70 to 600 μM , with sensitivity 466.0 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ and from 600 to 1000 μM with sensitivity 314.3 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$. The effect of interfering substances has been studied by differential pulse voltammetry and the determination of DA has been possible in presence of AA and UA, the sole compounds present in physiological samples with peak potential near to that of DA. Finally, the Au-AMD1 sensor was successfully used for the determination of DA in a commercial dopamine hydrochloride injection and in spiked Human urine.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Dirección General de Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Project No. CTQ-2009-12321-C02) for financial support of this research. C. Villena acknowledges the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral fellowship (BES-2010-028705).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.05.098>.

References

- [1] B.J. Plowman, S.K. Bhargava, A.P. O'Mullane, Electrochemical fabrication of metallic nanostructured electrodes for electroanalytical applications, *Analyst* 136 (2011) 5107–5119.
- [2] A.J. Arvia, R.C. Salvarezza, W.E. Triaca, Noble metal surfaces and electrocatalysis. Review and perspectives, *J. New Mater. Electrochem. Syst.* 7 (2004) 133–143.
- [3] A. Jimenez-Ruiz, P. Perez-Tejeda, E. Grueso, P.M. Castillo, R. Prado-Gotor, Nonfunctionalized gold nanoparticles: synthetic routes and synthesis condition dependence, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 9596–9609.
- [4] H.W. Hu, J.H. Xin, H. Hu, X.W. Wang, D.G. Miao, Y. Liu, Synthesis and stabilization of metal nanocatalysts for reduction reactions – a review, *J. Mater. Chem. A* 3 (2015) 11157–11182.
- [5] K. Mallick, Z.L. Wang, T. Pal, Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis, *J. Photochem. Photobiol. B* 140 (2001) 75–80.
- [6] C. Gutiérrez-Wing, R. Esparza, C. Vargas-Hernández, M.E. Fernández García, M. José-Yacamán, Microwave-assisted synthesis of gold nanoparticles self-assembled into self-supported superstructures, *Nanoscale* 4 (2012) 2281–2287.
- [7] V.S. Myers, M.G. Weir, E.V. Carino, D.F. Yancey, S. Pande, R.M. Crooks, Dendrimer-encapsulated nanoparticles: new synthetic and characterization methods and catalytic applications, *Chem. Sci.* 2 (2011) 1632–1646.
- [8] D. Astruc, L.Y. Liang, A. Rapakousiou, J. Ruiz, Click dendrimers and triazole-related aspects: catalysts, mechanism, synthesis, and functions. A bridge between dendritic architectures and nanomaterials, *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 630–640.
- [9] A. Rapakousiou, R. Djeda, M. Grillaud, N. Li, J. Ruiz, D. Astruc, “Click” assemblies and redox properties of arene- and gold-nanoparticle-cored triazolylbiferrocene-terminated dendrimers, *Organometallics* 33 (2014) 6953–6962.
- [10] D. Astruc, C. Ornelas, J. Ruiz, Metallocenyl dendrimers and their applications in molecular electronics sensing, and catalysis, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 841–856.
- [11] D. Astruc, Ferrocenyl dendrimers: multi-electron redox reagents and their applications, *New J. Chem.* 35 (2011) 764–772.
- [12] D. Astruc, Electron-transfer processes in dendrimers and their implication in biology catalysis, sensing and nanotechnology, *Nat. Chem.* 4 (2012) 255–267.
- [13] C.M. Casado, B. Alonso, J. Losada, M.P. García-Armada, Redox-active Organometallic dendrimers as electrochemical sensors, in: S. Campagna, P. Ceroni, F. Puntoriero (Eds.), *Designing Dendrimers*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2012, pp. 219–262.
- [14] Y. Wang, L. Salmon, J. Ruiz, D. Astruc, Metallodendrimers in three oxidation states with electronically interacting metals and stabilization of size-selected gold nanoparticles, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3489.
- [15] K. Takada, D.J. Díaz, H.D. Abruña, I. Cuadrado, C.M. Casado, B. Alonso, M. Morán, J. Losada, Redox-active ferrocenyl dendrimers: thermodynamics and kinetics of adsorption, in-situ electrochemical quartz crystal microbalance study of redox process and tapping mode AFM imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 10763–10773.
- [16] J. Losada, M.P. García-Armada, V. Robles, A.M. Martínez, C.M. Casado, B. Alonso, Carbosilane based dendritic cores functionalized with interacting ferrocenyl units: synthesis and electrocatalytic properties, *New J. Chem.* 35 (2011) 2187–2195.
- [17] G. de la Cruz, H. Schüle, J. Losada, M.P. García Armada, H. Frey, B. Alonso, C.M. Casado, Electrochemical properties of carbosilane-based hyperbranched polymers functionalized with interacting ferrocenyl units, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2013) 44–53.
- [18] C. Villena, J. Losada, M.P. García Armada, C.M. Casado, B. Alonso, Synthesis and electrochemical anion sensing properties of a biferrocenyl-functionalized Dendrimer, *Organometallics* 31 (2012) 3284–3291.
- [19] A. Jiménez, M.P. García Armada, J. Losada, C. Villena, B. Alonso, C.M. Casado, Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles, *Sens. Actuator B* 190 (2014) 111–119.
- [20] M.P. García Armada, E. Vallejo, C. Villena, J. Losada, C.M. Casado, B. Alonso, New acetaminophen amperometric sensor based on ferrocenyl dendrimers deposited onto Pt nanoparticles, *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 1551–1563.
- [21] C. Villena, J. Losada, B. Alonso, C.M. Casado, M.P. García Armada, Easy preparation of electrode surfaces with dispersed size-controlled Au nanoparticles by electrodeposited PPI-dendrimers as templates, *J. Electrochem. Soc.* 164 (2017) H396–H406, <http://dx.doi.org/10.1149/2.1611706jes>.
- [22] I.E. Araujo, J.G. Ferreira, L.A. Tellez, X. Ren, C.W. Yeckel, The gut?brain dopamine axis: a regulatory system for caloric intake, *Physiol. Behav.* 106 (2012) 394–399.
- [23] K. Jackowska, P. Krysinski, New trends in the electrochemical sensing of dopamine, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3753–3771.
- [24] N. Yusoff, A. Pandikumar, R. Ramaraj, H.N. Lim, N.M. Huang, Gold nanoparticles based optical and electrochemical sensing of dopamine, *Microchim. Acta* 182 (2015) 2091–2114.
- [25] S. Lupu, C. Lete, M. Marin, N. Totir, P.C. Balaure, Electrochemical sensors based on platinum electrodes modified with hybrid inorganic-organic coatings for determination of 4-nitrophenol and dopamine, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1932–1938.
- [26] Y. Zhao, Y. Gao, D. Zhan, H. Liu, Q. Zhao, Y. Kou, Y. Shao, M. Li, Q. Zhuang, Z. Zhu, Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes ionic liquid gel modified electrode, *Talanta* 66 (2005) 51–57.
- [27] D.V. Chernyshov, N.V. Shvedene, E.R. Antiova, I.V. Pletnev, Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines, *Anal. Chim. Acta* 621 (2008) 178–184.
- [28] M. Sofuoglu, R.A. Sewell, Norepinephrine and stimulant addiction, *Addict. Biol.* 14 (2009) 119–129.
- [29] A. Galvan, T. Wichmann, Pathophysiology of Parkinsonism, *Clin. Neurophysiol.* 119 (2008) 1459–1474.
- [30] J.M. Swanson, N.D. Volkov, Psychopharmacology: concepts and opinions about the use of stimulant medications, *J. Child Psychol. Psychiatry* 50 (2009) 180–193.
- [31] S.H. Kollins, J.S. March, Advances in the pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry* 62 (2007) 951–953.

- [32] J.W. Dalley, J.P. Roiser, Dopamine, serotonin and impulsivity, *Neuroscience* 215 (2012) 42–58.
- [33] R. Devasenathipathy, V. Mani, S.M. Chen, B. Viswanath, V.S. Vasantha, M. Govindasamy, Electrodeposition of gold nanoparticles on a pectin scaffold and its electrocatalytic application in the selective determination of dopamine, *RSC Adv.* 4 (2014) 55900–55907.
- [34] C.Y. Lee, D.Y. Hsu, A. Prasanna, R. Kalavani, P.D. Hong, Facile synthesis of hexagonal-shaped polypyrrole self-assembled particles for the electrochemical detection of dopamine, *Appl. Surf. Sci.* 363 (2016) 451–458.
- [35] G. Fabregat, E. Armelin, C. Alemañ, Selective detection of dopamine combining multilayers of conducting polymers with gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 4669–4682.
- [36] W. Chu, Q. Zhou, S. Li, W. Zhao, N. Li, J. Zheng, Oxidation and sensing of ascorbic acid and dopamine on self-assembled gold nanoparticles incorporated within polyaniline film, *Appl. Surf. Sci.* 353 (2015) 425–432.
- [37] E.A. Khudaish, F. Al-Nofli, J.A. Rather, M. Al-Hinaai, K. Laxman, H.H. Kyawc, S. Al-Harthy, Sensitive and selective dopamine sensor based on novel conjugated polymer decorated with gold nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.* 761 (2016) 80–88.
- [38] M. Sajid, M.K. Nazal, M. Mansha, A. Alsharaa, S.M.S. Jillani, C. Basheer, Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: a review, *Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 15–29.
- [39] J. Matsui, K. Akamatsu, S. Nishiguchi, D. Miyoshi, H. Nawafune, K. Tamaki, N. Sugimoto, Composite of Au nanoparticles and molecularly imprinted polymer as a sensing material, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1310–1315.
- [40] A.I. Gopalan, K.P. Lee, K.M. Manesh, I. P. Santhosh, J.H. Kim, J.S. Kang, Electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid at a novel gold nanoparticle distributed poly-(4-aminothiophenol) modified electrode, *Talanta* 71 (2007) 1774–1781.
- [41] A.J. Wang, J.J. Feng, Y.F. Li, J.L. Xi, W.J. Dong, In-situ decorated gold nanoparticles on polyaniline with enhanced electrocatalysis toward dopamine, *Microchim. Acta* 171 (2010) 431–436.
- [42] Q. Lian, A. Luo, Z. An, Z. Li, Y. Guo, D. Zhang, Z. Xue, X. Zhou, X. Lu, Au nanoparticles on tryptophan-functionalized graphene for sensitive detection of dopamine, *Appl. Surf. Sci.* 349 (2015) 184–189.
- [43] T.D. Thanh, J. Balamurugan, S.H. Lee, N.H. Kim, J.H. Lee, Effective seed-assisted synthesis of gold nanoparticles anchored nitrogen-doped graphene for electrochemical detection of glucose and dopamine, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 259–267.
- [44] G.Z. Hu, D.P. Zhang, W.L. Wu, Z.S. Yang, Selective determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using nano-Au self-assembly glassy carbon electrode, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 62 (2008) 199–205.
- [45] C. Xue, Q. Han, Y. Wang, J. Wu, T. Wen, R. Wang, J. Hong, X. Zhoun, H. Jiang, Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensors based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 199–203.
- [46] C.Y. Yang, S.M. Chen, S. Palanisamy, Simultaneous electrochemical determination of dopamine uric acid, tryptophan on electropolymerized aminothiazole and gold nanoparticles modified carbon nanotubes modified electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 11 (2016) 2638–2649.
- [47] L. Yang, N. Huang, Q. Lu, M. Liu, H. Li, Y. Zhang, S. Yao, A quadruplet electrochemical platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid dopamine, uric acid and acetaminophen based on a ferrocene derivative functional Au NPs/carbon dots nanocomposite and graphene, *Anal. Chim. Acta* 903 (2016) 69–80.
- [48] I. Cuadrado, M. Morán, C.M. Casado, B. Alonso, F. Lobete, B. García, M. Ibsate, J. Losada, Ferrocenyl-functionalized poly(propyleneimine) dendrimers, *Organometallics* 15 (1996) 5278–5280.
- [49] H.D. Abruña, *Electrochemical Interfaces: Modern Techniques for In-Situ Interface Characterization*, VCH Pub, Florida, U.S.A., 1991.
- [50] M.E.G. Lyons, *Electroactive Polymer Electrochemistry*, Ed. Plenum Press, New York, 1994.
- [51] R.W. Murray, Chemically modified electrodes, in: A.J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, vol. 13, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 191–368.
- [52] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979) 19–28.
- [53] X.L. Wen, Y.H. Hua, A.L. Liu, Micellar effects on the electrochemistry of dopamine and its selective detection in the presence of ascorbic acid, *Talanta* 50 (1999) 1027–1033.
- [54] H. Doménech, M.T. García, M.S. Doménech-Carbó, Galletero 2,4,6-Triphenylpyrylium ion encapsulated into zeolite y as a selective electrode for the electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Anal. Chem.* 74 (2002) 562–569.
- [55] J.A. Harrison, Z.A. Khan, The oxidation of hydrazine on platinum in acid solution, *J. Electroanal. Chem.* 28 (1970) 131–138.
- [56] M.P. García Armada, J. Losada, F.J. Lopez-Villanueva, H. Frey, B. Alonso, C.M. Casado, Electrochemical and bioelectrocatalytic properties of novel block-copolymers containing interacting ferrocenyl units, *J. Organomet. Chem.* 693 (2008) 2803–2811.
- [57] Q. Chi, S. Dong, Electrocatalytic oxidation and flow injection determination of reduced nicotinamide coenzyme at a glassy carbon electrode modified by a polymer thin film, *Analyst* 119 (1994) 1063–1066.
- [58] B. Bali, D. Jauhari, M. Prasad, A dual-template imprinted polymer-modified carbon ceramic electrode for ultra-trace simultaneous analysis of ascorbic acid and dopamine, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 19–27.
- [59] V.G. Levich, *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1962.
- [60] J. Koutecky, V.G. Levich, The use of a rotating disk electrode in the studies of electrochemical kinetics and electrolytic processes, *Zh. Fiz. Khim.* 32 (1956) 1565–1575.
- [61] F.D. Munteanu, L. Gorton, Effect of pH on the catalytic electrooxidation of NADH using different two- electron mediators immobilized on zirconium phosphate, *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 2–10.
- [62] C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, F. Hu, M. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized-polyimidazole composite modified glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta* 741 (2012) 15–20.
- [63] E. Haghshenas, T. Madrakian, A. Afkhami, Electrochemically oxidized multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode as a probe for simultaneous determination of dopamine and doxorubicin in biological samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2577–2586.
- [64] R.K. Shervedani, M. Bagherzadeh, S.A. Mozaffari, Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor, *Sens. Actuators B: Chem.* 115 (2006) 614–621.

**Size-controlled gold nanoparticles obtained from electrodeposited
amidoferrocenylpoly(propyleneimine) dendrimer-templates for the
electrochemical sensing of dopamine**

Carlos Villena^a, Marta Bravo^a, Beatriz Alonso^b, Carmen M. Casado^b José Losada^{*,a}, M.
Pilar García Armada^{*,a}

Supplementary material

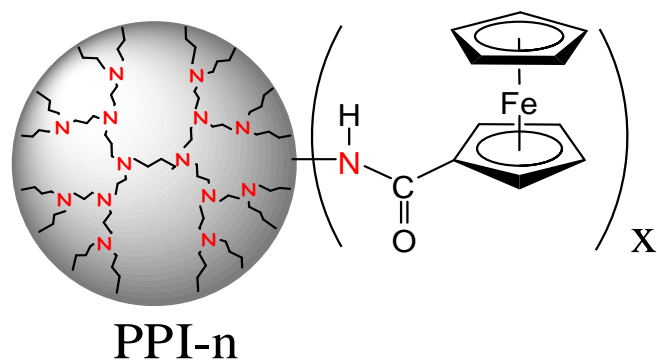


Chart S1. Ferrocenyl-dendrimers scheme. AMD1: $n=1$, $x=4$; AMD5: $n=5$, $x=64$.

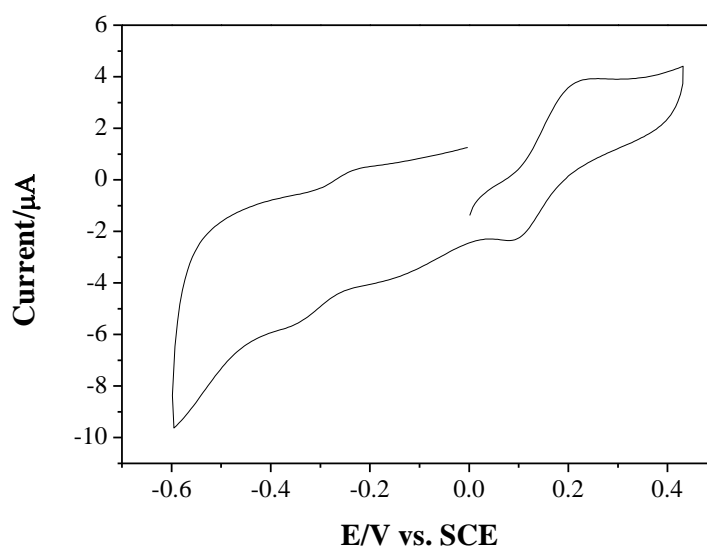


Figure S1. CVs obtained for an AMD5 modified electrode ($6.9 \cdot 10^{-10}$ mol Fc cm^{-2}) in presence of 0.5 mM dopamine in PBS pH 7. Scan rate 20 mV s^{-1} .

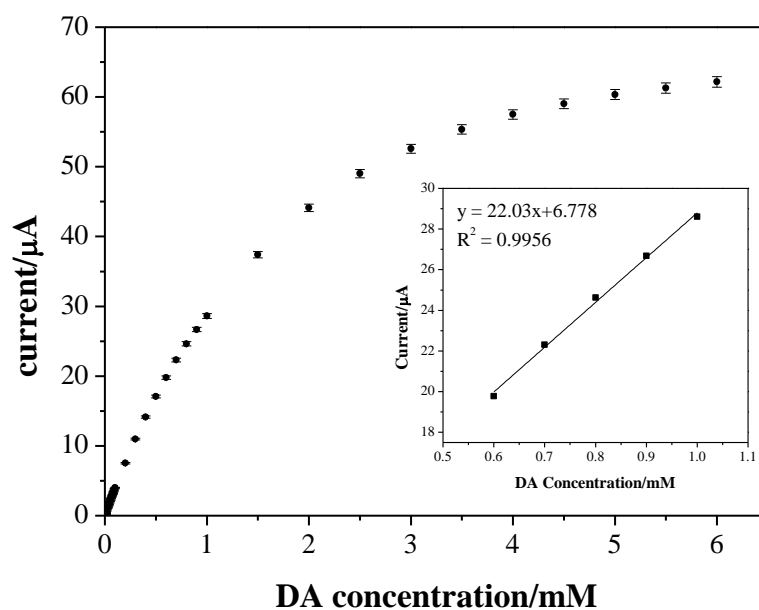


Figure S2. Calibration plot obtained with Au-AMD1 at 0.3 V vs. SCE in PBS pH 7.0 and 500 rpm. Inset: third linear range.

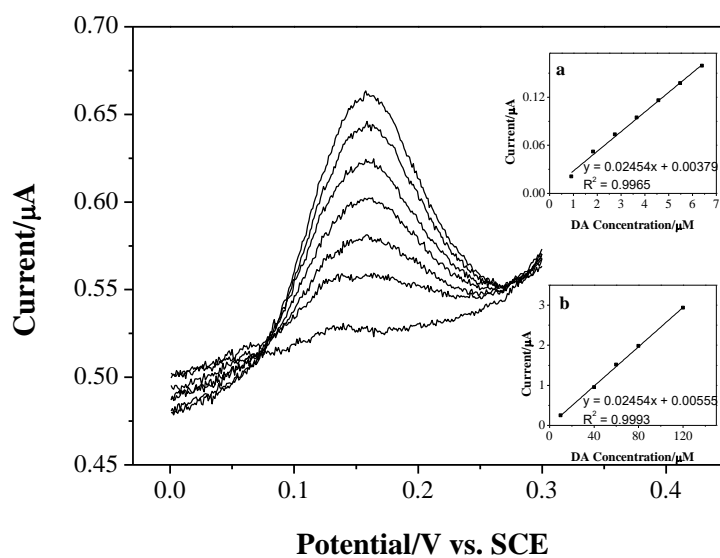


Figure S3. DPV profiles at AuNPs-AMD1 electrode in PBS pH 7.0 containing DA quantities between 1 and 6.4 μM. Insets: Plots of the oxidative peak currents versus the DA concentration in two concentration groups. DPV settings: modulation time 0.1 s; interval time 0.2 s; modulation amplitude 0.01 V and scan rate 5.25 mV s⁻¹.

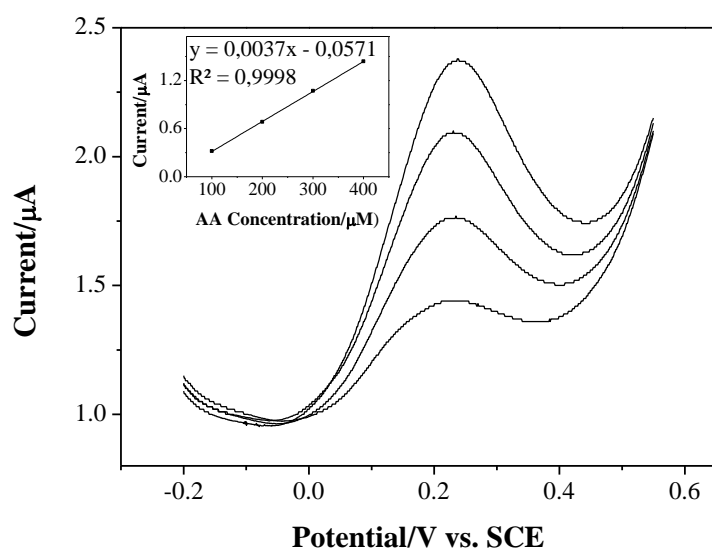


Figure S4. DPV profiles at AuNPs-AMD1 electrode in PBS pH 7.0 containing AA 100, 200, 300 and 400 μM . Inset: Plot of the peak currents versus the AA concentration. DPV settings: modulation time 0.05 s; interval time 0.2 s; modulation amplitude 0.05 V and scan rate 5.25 mV s^{-1} .

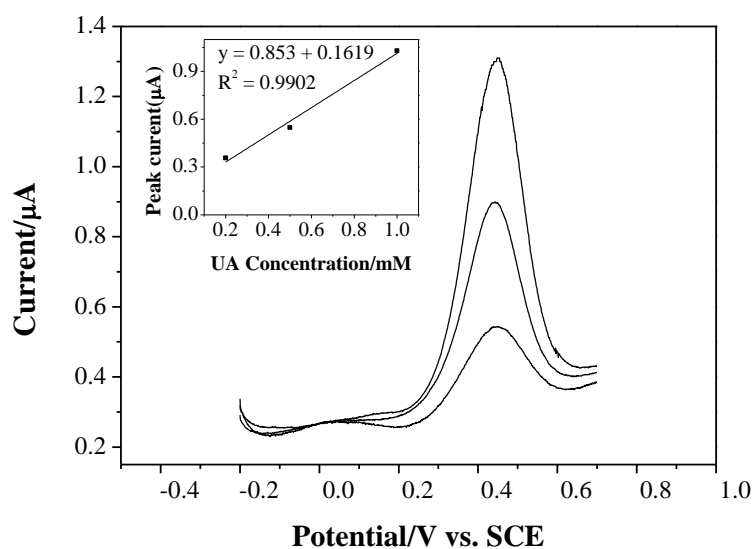


Figure S5. DPV profiles at AuNPs-AMD1 electrode in PBS pH 7.0 containing UA 200, 500 and 1000 μM . Inset: Plot of the peak currents versus the UA concentration. DPV settings: modulation time 0.1 s; interval time 0.2 s; modulation amplitude 0.01 V and scan rate 5.25 mV s^{-1} .

Table S1 Comparison with reported DA electrochemical sensors

Electrode	E (V vs. SCE)	Sensitivity ($\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$)	Linear range (μM)	Detection limit (μM)	Ref.
PPY-IC GCE	0.40	154	10-300	0.10	[1]
AuNPS-PTAP/GCE	0.15 (DPV)	6580*	0.15-1.5	0.02	[2]
Fc-S-Au/C NC/graphene/GCE	0.15 (DPV)	1484	0.40-45	0.05	[3]
AuNP/NG-ITO	0.35	38.0	0-48	0.001	[4]
Au/ZnO/N-doped graphene/GCE	0.15 (DPV)	294*	2-180	0.40	[5]
HNP-AuAg	0.45 (DPV)	194.6			[6]
	0.60	399.6	5-335	0.20	
Mn complex-goldE	0.15 (DPV)	250	0-800	0.01	[7]
f-MWCNT/AuNPs-AT	0.3 (DPV)	13530	10-50	0.18	[8]
AuNP/PAN/ITO	0.58	92.84	1-100	0.91	[9]
AuNPs/Trp-GR GCE	0.45 (DPV)	7323	0.5-90	0.06	[10]
		1215	90-411		
Au-Pt/GO-ERGO GCE	0.15 (DPV)	384	0.07-4980	0.02	[11]
AuNCs/AGR/MWCNT	0.2 (DPV)	4285.7	1-201	0.08	[12]
Au/NPSS	0.15 (DPV)	4400	3-80	0.02	[13]
AuNPs/SPCs	0.15 (DPV)	427	0.2-100	0.01	[14]
Au-PEDOT/PNMPy/PEDOT	0.15 (CV)	190	0-100	2	[15]
AuNPs-AMD1	0.30	585.7	0-70	0.01	This
		466.0	70-600		work
		314.3	600-1000		
	0.15 (DPV)	347.1	0.5-120	0.06	

* $\mu\text{A}/\text{mM}$, area unknown

References

- 1 C.Y. Lee, D. Y. Hsu, A. Prasannan, R. Kalaivani, P. D. Hong, Facile synthesis of hexagonal-shaped polypyrrole self-assembled particles for the electrochemical detection of dopamine, *Appl. Surf. Sci.* 363 (2016) 451-458.
- 2 E. A. Khudaish, F. Al-Nofli, J. A. Rather, M. Al-Hinaai, K. Laxman, H. H. Kyawc, S. Al-Harthy, Sensitive and selective dopamine sensor based on novel conjugated polymer decorated with gold nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.* 761 (2016) 80–88.
- 3 L. Yang, N. Huang, Q. Lu, M. Liu, H. Li, Y. Zhang, S. Yao, A quadruplet electrochemical platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen based on a ferrocene derivative functional Au NPs/carbon dots nanocomposite and graphene, *Anal. Chim. Acta*, 903 (2016) 69-80.
- 4 T. D. Thanh, J. Balamurugan, S. H. Lee, N. H. Kim, J. H. Lee, Effective seed-assisted synthesis of gold nanoparticles anchored nitrogen-doped graphene for electrochemical detection of glucose and dopamine, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 259–267.
- 5 X. Chen, G. Zhang, L. Shi, S. Pana, W. Liua, H. Pan, Au/ZnO hybrid nanocatalysts impregnated in N-doped graphene for simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen and dopamine, *Mater. Sci. Tech. Ser. C* 65 (2016) 80–89.

- 6 J. Hou, C. Xu, D. Zhao, J. Zhou, Facile fabrication of hierarchical nanoporous AuAg alloy and its highly sensitive detection towards dopamine and uric acid, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 225 (2016) 241–248.
- 7 A. Gorczyński, D. Pakulski, M. Szymańska, M. Kubicki, K. Bułat, T. Łuczak, V. Patroniak, Electrochemical deposition of the new manganese(II) Schiff-base complex on a gold template and its application for dopamine sensing in the presence of interfering biogenic compounds, *Talanta* 149 (2016) 347–355.
- 8 C. Y. Yang, S. M. Chen, S. Palanisamy, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid, tryptophan on electropolymerized aminothiazole and gold nanoparticles modified carbon nanotubes modified electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 11 (2016) 2638–2649.
- 9 W. Chu, Q. Zhou, S. Li, W. Zhao, N. Li, J. Zheng, Oxidation and sensing of ascorbic acid and dopamine on self-assembled gold nanoparticles incorporated within polyaniline film, *Appl. Surf. Sci.* 353 (2015) 425–432.
- 10 Q. Lian, A. Luo, Z. An, Z. Li, Y. Guo, D. Zhang, Z. Xue, X. Zhou, X. Lu, Au nanoparticles on tryptophan-functionalized graphene for sensitive detection of dopamine, *Appl. Surf. Sci.* 349 (2015) 184–189.
- 11 Y. Liu, P. She, J. Gong, W. Wu, S. Xu, J. Li, K. Zhao, A. Deng, A novel sensor based on electrodeposited Au–Pt bimetallic nano-clusters decorated on graphene oxide (GO)–electrochemically reduced GO for sensitive detection of dopamine and uric acid, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 221 (2015) 1542–1553.
- 12 A. Abdelwahaba, Y. Shimb, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and folic acid based on activated graphene/MWCNT nanocomposite loaded Au nanoclusters, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 221 (2015) 659–665.
- 13 B. Rezaei, E. Havakeshian, A. A. Ensafi, Decoration of nanoporous stainless steel with nanostructured gold via galvanic replacement reaction and its application for electrochemical determination of dopamine, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 213 (2015) 484–492.
- 14 P. Gupta, R. N. Goyal, Y. Shim, Simultaneous analysis of dopamine and 5-hydroxyindoleacetic acid at nanogold modified screen printed carbon electrodes, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 213 (2015) 72–81.
- 15 G. Fabregat, E. Armelin, C. Alemán, Selective detection of dopamine combining multilayers of conducting polymers with gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 4669–4682.

