



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Síntesis y Caracterización de Óxido de Grafeno  
Reducido Funcionalizado con Nanopartículas  
Metálicas. Aplicación en el Desarrollo de Sensores  
Amperométricos Basados en Materiales  
Nanoestructurados**

**Jordi Rodríguez Rodríguez**

TESIS DOCTORAL  
DOCTORADO EN QUÍMICA

DIRECTORES:

Dr. Francisco Céspedes Mulero

Dra. María del Mar Baeza Labat

**DEPARTAMENT DE QUÍMICA**

**FACULTAT DE CIÈNCIES**

**2020**





Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Síntesis y Caracterización de Óxido de Grafeno  
Reducido Funcionalizado con Nanopartículas  
Metálicas. Aplicación en el Desarrollo de Sensores  
Amperométricos Basados en Materiales  
Nanoestructurados**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR:

**Jordi Rodríguez Rodríguez**

VISTO BUENO:

Dr. Francisco Céspedes Mulero

Dra. María del Mar Baeza Labat

Bellaterra, 18 de diciembre de 2020



El trabajo descrito en la presente memoria se ha llevado a cabo gracias a la financiación de la **Beca predoctoral PIF** (Personal Investigador en Formació) convocatoria 2015. Concedida por la Universitat Autònoma de Barcelona.



**A mi abuela, Anita.**



“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado.”

Marie Curie

“Lo que hacemos en esta vida, tiene su eco en la eternidad.”

Máximo Décimo Meridio, Gladiator

“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza.”

Albert Einstein



# TABLA DE CONTENIDOS

---

Índice .....	i
Abreviaturas y símbolos .....	vii
Resumen .....	xi
Abstract .....	xiii

## CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Sensores Químicos .....	4
1.2 Sensores amperométricos .....	7
1.3 Materiales usados en la construcción de sensores amperométricos .....	10
1.4 Sensores electroquímicos basados en oxido de grafeno reducido .....	14
1.5 Grafeno funcionalizado con nanopartículas metálicas .....	17
1.6 Síntesis intermatricial de rGO-nanocompuestos con nanopartículas .....	19
1.7 Nanocompuestos de grafeno para el desarrollo de sensores electroquímicos ..	20
1.8 Caracterización de los electrodos nanocompuestos basados en oxido de grafeno reducido .....	25
1.8.1 Caracterización electroquímica: Espectroscopia electroquímica de impedancia y voltamperometría cíclica .....	25
1.8.1.1 Espectroscopia electroquímica de impedancia .....	26
1.8.1.2 Voltamperometría cíclica .....	28
1.8.1.3 Amperometría hidrodinámica .....	31
1.9 Biosensores amperométricos basados en nanocompuestos de óxido de grafeno reducido .....	33
1.9.1 Biosensores enzimáticos .....	34

1.9.1.1 Biosensor de glucosa oxidasa .....	36
1.10 Bibliografía .....	38

## **CAPÍTULO 2**

OBJETIVOS .....	53
-----------------	----

## **CAPÍTULO 3**

MATERIALES Y METODOS .....	57
3.1 Reactivos y disoluciones .....	57
3.2 Síntesis de nanomateriales basados en óxido de grafeno reducido para la construcción de electrodos nanocompuestos .....	58
3.2.1 Síntesis de grafeno oxidado y óxido de grafeno reducido .....	59
3.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas metálicas .....	60
3.2.2.1 Funcionalización del óxido de grafeno reducido con nanopartículas de plata .....	61
3.2.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de oro .....	61
3.2.2.3 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de paladio .....	62
3.2.2.4 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de oro y paladio .....	62
3.3 Síntesis intermatricial de nanopartículas metálicas .....	63
3.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando la resina catiónica C100- E .....	63
3.3.2 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando la resina catiónica C100-E .....	64
3.4 Construcción de electrodos nanocompuestos .....	64

3.4.1 Construcción de electrodos nanocompuestos basados en nanocompuestos de rGO funcionalizado con NPs metálicas .....	65
3.4.1.1 Construcción de los biosensores de glucosa oxidasa .....	66
3.5 Técnicas de caracterización e instrumentación .....	67
3.5.1 Microscopia electrónica .....	67
3.5.2 Análisis termogravimétrico .....	67
3.5.3 Técnicas espectroscópicas .....	68
3.6 Caracterización y evaluación de los diferentes electrodos y biosensores construidos .....	68
3.6.1 Caracterización eléctrica. Curva de percolación .....	69
3.6.2 Voltamperometría cíclica .....	69
3.6.3 Espectroscopia electroquímica de impedancia .....	70
3.6.4 Voltamperometría de barrido lineal .....	70
3.6.5 Caracterización electroanalítica .....	71
3.7 Bibliografía .....	71

## **CAPÍTULO 4**

SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO PARA LA FABRICACIÓN DE TRANSDUCTORES NANOCOMPÓSITOS .....	75
4.1 Síntesis de grafeno oxidado y óxido de grafeno reducido .....	77
4.1.1 Caracterización morfológica del material de partida .....	78
4.1.2 Caracterización morfológica del óxido de grafeno reducido .....	79
4.1.3 Caracterización espectroscópica de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido .....	81
4.1.4 Caracterización eléctrica de los transductores .....	83
4.1.5 Caracterización electroquímica mediante voltamperometría cíclica .....	85
4.1.6 Espectroscopia electroquímica de impedancia .....	90

4.2 Caracterización electroanalítica mediante amperometría hidrodinámica .....	93
4.2.1 Determinación del potencial de polarización .....	94
4.2.2 Calibrados de los sensores .....	95
4.3 Conclusiones .....	97
4.4 Bibliografía .....	98

## **CAPÍTULO 5**

SÍNTESIS DE MATERIALES HÍBRIDOS PARA EL DESARROLLO DE TRANSDUCTORES BASADOS EN NANOCOMPOSITOS DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO .....	105
5.1 Síntesis intermatricial de nanopartículas metálicas .....	107
5.1.1 Síntesis intermatricial de nanopartículas de Ag utilizando un polímero de intercambio catiónico .....	108
5.1.2 Síntesis intermatricial de nanopartículas de Au utilizando un polímero de intercambio catiónico .....	111
5.2 Funcionalización del oxido de grafeno reducido con nanopartículas metálicas .....	113
5.2.1 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con NPs de Ag, Au y Pd .....	114
5.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas bimetálicas de Au/Pd .....	116
5.2.2.1 Caracterización cristalográfica por rayos-X .....	118
5.2.3 Termogravimetría de materiales híbridos basados en oxido de grafeno reducido .....	118
5.3 Conclusiones .....	120
5.4 Bibliografía .....	120

## **CAPÍTULO 6**

DESARROLLO DE BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN NANOCOMPÓSITOS DE MATERIALES HÍBRIDOS .....	127
6.1 Electrodo nanocompósito basado en óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas metálicas .....	128
6.1.1 Electrodo nanocompósito basado en óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas de Ag .....	128
6.1.2 Electrodo modificado con óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas metálicas de Au y Pd .....	130
6.1.3 Determinación del potencial de trabajo para la detección de peróxido de hidrógeno mediante voltamperometría de barrido lineal .....	137
6.1.4 Características electroanalíticas de los electrodos con nanomateriales funcionalizados con NPs metálicas e híbridas .....	142
6.2 Biosensores basados en electrodos nanocompósitos de materiales híbridos y glucosa oxidasa .....	147
6.2.1 Caracterización electroanalítica de los biosensores basados en nanocompósitos de materiales híbridos/glucosa oxidasa .....	151
6.2.2 Caracterización electroanalítica y evaluación de la respuesta analítica de los (bio)sensores .....	154
6.2.3 Estudio preliminar de la adaptación de composición del (bio)compósito nanoestructurado al uso de medidas diferenciales .....	162
6.3 Conclusiones .....	166
6.4 Bibliografía .....	167

## **CAPÍTULO 7**

CONCLUSIONES .....	171
--------------------	-----



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
§	Apartado
$I^0$	Amplitud de corriente
A	Área electroactiva
Q	Cantidad de corriente
$C_{dl}$	Capacidad de la doble capa
$C_0$	Concentración de analito en la superficie del electrodo
$C_a$	Concentración especie electroactiva
F	Constante de Faraday
$D_a$	Coefficiente de difusión
$Z_{imag}$	Componente imaginario de la impedancia
$Z_{real}$	Componente real de la impedancia
j	Densidad de corriente
CVD	Deposición química de vapor ( <i>Chemical Vapor Deposition</i> )
Ø	Desplazamiento en fase
ΔE	Diferencia de potencial
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina ( <i>flavín adenín dinucleótido</i> )
FADH2	Dinucleótido de flavina y adenina. Forma reducida ( <i>flavín adenín dinucleótido</i> )
ESI	Electrodo selectivo de iones ( <i>ion-selective electrodes</i> )
EIS	Espectroscopia electroquímica de impedancia ( <i>Electrochemical impedance spectroscopy</i> )
ω	Frecuencia angular
GOD	Glucosa oxidasa
Hz	Hercios

Z	Impedancia eléctrica
I	Intensidad de corriente eléctrica
$I_p^a$	Intensidad de pico anódico
$I_p^c$	Intensidad de pico catódico
$\mu$	Micro
SEM	Microscopia electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
TEM	Microscopia electrónica de transmisión ( <i>Transmission electron microscopy</i> )
NP	Nanopartícula
MWCNT	Nanotubos de carbono ( <i>Multi-walled carbon nanotubes</i> )
n	Numero de moles
LUMO	Orbital molecular no ocupado de más baja energía ( <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
HOMO	Orbital molecular ocupado de más energía ( <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
GO	Óxido de grafeno ( <i>Graphene oxide</i> )
rGO	Óxido de grafeno reducido ( <i>Reduced Graphene Oxide</i> )
GrO	Óxido de grafito
PVC	Policloruro de vinilo
E	Potencial
$E_p^a$	Potencial de pico anódico
$E_p^c$	Potencial de pico catódico
RCT	Resistencia a la transferencia de carga
$R\Omega$	Resistencia óhmica
s	Segundos
FIA	Sistema de flujo continuo (Flow Injection Analysis)
T	Temperatura
t	Tiempo

ISFET	Transistor de efecto de campo sensible a iones ( <i>ion-sensitive field effect transistors</i> )
PTC	Umbral de percolación (Percolation Threshold)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
$v$	Velocidad de reacción
CV	Voltamperometría cíclica ( <i>Cyclic Voltammetry</i> )
V	Voltios
W	Warburg
HRC	Zona de alta resistividad ( <i>Higher Resistivity Composition</i> )
LRC	Zona de baja resistividad ( <i>Low Resistivity Composition</i> )
PC	Zona de percolación ( <i>Percolation Composition</i> )



## RESUMEN

---

El desarrollo de nuevos sensores y (bio)sensores es un campo en pleno desarrollo dentro de las necesidades de la Química Analítica y, en general, de la sociedad. El uso de sensores está altamente extendido en la vida cotidiana de las personas. En el mercado, se encuentran disponibles distintos tipos de glucómetros, que pueden informar de la concentración de glucosa en sangre en tiempo real del paciente. También se puede observar la necesidad de hoy en día de desarrollar nuevos test de diagnóstico para enfermedades como la provocada por el virus SARS-COVID-19. Cada día se desarrollan nuevos sensores que ofrecen mejores prestaciones analíticas, mejores sensibilidades y límites de detección, junto con una mayor robustez, a un precio inferior al de los primeros diseños. Esto es debido al descubrimiento de nuevos materiales y a su posterior incorporación en los sensores aplicados a analitos de interés en todos los ámbitos.

El grafeno se ha convertido en un material de gran interés entre la comunidad científica, debido a las propiedades eléctricas, térmicas y mecánicas únicas que este material posee respecto a otros materiales carbonáceos y 2D. Debido a sus excepcionales características y propiedades el uso de grafeno como material conductor alternativo en el desarrollo de transductores electroquímicos se ha extendido ampliamente y convertido en uno de los principales recursos.

Los nanocompuestos se sitúan como una alternativa muy interesante en el desarrollo de sensores amperométricos. Debido, especialmente, a la capacidad de integrar varios materiales con diferentes características con la finalidad de obtener un nuevo material con propiedades físicas, mecánicas y eléctricas muy diferentes a los materiales originales que lo constituyen. El uso de nanocompuestos presenta una serie de ventajas respecto a los conductores puros. Estas ventajas son, por ejemplo, versatilidad, durabilidad, facilidad de regeneración de la superficie y su capacidad de integración de otros modificadores, cualidades que proporcionan un valor añadido a los dispositivos desarrollados.

Las propiedades electroquímicas de los nanocompuestos están altamente influenciadas por la naturaleza de las partículas conductoras que lo forman, así como la cantidad y la distribución espacial de estas en la matriz del nanocompuesto. Una de las características más relevantes que poseen estos materiales es la similitud en su comportamiento

electroquímico respecto a un haz de microelectrodos. La presencia de partículas conductoras, separadas por áreas no conductoras o aislantes en la superficie del electrodo, mimetiza la distribución más o menos ordenada de microelectrodos separados entre sí por un aislante eléctrico, configurando así un haz de microelectrodos. La respuesta electroanalítica de un haz de microelectrodos depende fundamentalmente de las dimensiones y separación entre las partículas conductoras. Por este motivo, es necesaria una optimización de la cantidad de material conductor y de su distribución con el objetivo de obtener la mejor eficacia analítica.

Bajo este contexto, la primera etapa de esta Tesis es la síntesis de óxido de grafeno reducido (rGO) mediante el método de Hummers. Este método permite obtener rGO utilizando grafito comercial como material de partida para la fabricación de electrodos nanocompuestos basados en rGO y una resina epoxi (EpoTek H77). Posteriormente, se ha implementado un conjunto de técnicas instrumentales que, aplicadas de forma estratégica y sistemática, han permitido la caracterización y optimización de la composición del material conductor; así como la mejora de las propiedades electroquímicas de los electrodos nanocompuestos desarrollados con los diferentes materiales conductores sintetizados.

Una vez optimizadas las propiedades de los transductores electroquímicos se procedió a la mejora de las propiedades analíticas de estos sensores electroquímicos, mediante la incorporación de diferentes nanopartículas (NPs) metálicas, con el objetivo de introducir un efecto electrocatalítico en el dispositivo analítico. De esta manera, se desarrolló una metodología sintética, la cual permite incorporar *ad hoc* NPs de diferentes metales (*e.g* Au, Ag, Pd) en la superficie del rGO, de una manera sencilla y mediante química verde.

Finalmente, se ha desarrollado un (bio)sensor utilizando la enzima glucosa oxidasa (GOD), basado en un nanocompuesto de 2Au/3Pd-NP@rGO. Estudiando el efecto catalítico que tienen las NPs *bimetálicas* de Au y Pd frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para finalizar, se estudió el efecto de la presencia del ácido ascórbico en las medidas electroanalíticas (una interferencia presente en muchas muestras biológicas).

## SUMMARY

---

The development of new sensors and (bio)sensors is a field in full development within the needs of Analytical Chemistry and society in general. The use of sensors is highly extended in people's daily life. Different types of glucometers are available on the market, which can report the concentration of glucose in the patient's blood in real time. Also, one can see today's need to develop new diagnostic tests for diseases, such as that caused by the SARS-COVID-19 virus. Every day new sensors are developed that offer better analytical performance, better sensitivities and detection limits, along with greater robustness, at a lower price than the first designs. This is due to the discovery of new materials and their subsequent incorporation into the sensors applied to analytes of interest in all areas.

Graphene has become a material of great interest among the scientific community, due to the unique electrical, thermal and mechanical properties that this material possesses with respect to other carbonaceous and 2D materials. Due to its exceptional characteristics and properties, the use of graphene as an alternative conductor material in the development of electrochemical transducers has become widespread and one of the main resources.

Nanocomposites are a very interesting alternative in the development of amperometric sensors. Due, especially, to the capacity of integrating several materials with different characteristics in order to obtain a new material with very different physical, mechanical and electrical properties from the original materials that constitute it. The use of nanocomposites has a series of advantages over pure conductors. These advantages are, for example, versatility, durability, ease of surface regeneration and its ability to integrate other modifiers, qualities that provide added value to the developed devices.

The electrochemical properties of nanocomposites are highly influenced by the nature of the conductive particles that form it as well as their amount and spatial distribution in the matrix of the nanocomposite. One of the most relevant characteristics of these materials is the similarity in their electrochemical behavior with respect to a microelectrode array. The presence of conductive particles, separated by non-conductive or insulating areas on the electrode surface, mimics the more or less ordered distribution of microelectrodes separated by an electrical insulator, forming the equivalent of a microelectrode array. The

electro-analytical response of a microelectrode array depends mainly on the dimensions and separation between the conductive particles. For this reason, it is necessary to optimize the quantity of conductive material and its distribution to obtain the best analytical efficiency.

In this context, the first stage of this Thesis is the synthesis of reduced graphene oxide (rGO) by Hummers' method. This method allows obtaining rGO, from commercial graphite as a starting material, for the manufacture of nanocomposite electrodes based on rGO and an epoxy resin (EpoTek H77). Subsequently, a set of instrumental techniques have been implemented, which, applied in a strategic and systematic way, have allowed the characterization and optimization of the composition of the conductive material as well as the improvement of the electrochemical properties of the nanocomposite electrodes developed with different synthesized conductive materials.

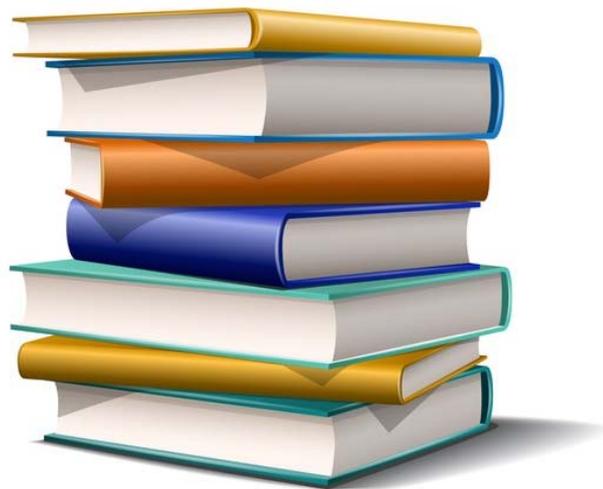
Once the properties of the electrochemical transducers were optimized, it was time to improve the analytical properties of these electrochemical sensors through the incorporation of different metallic nanoparticles (NPs) with the aim of introducing an electrocatalytic effect into the analytical device. This way a synthetic methodology was developed, allowing the incorporation *ad hoc* of different metal NPs (e.g. Au, Ag, Pd) on the rGO's surface in a simple way and by means of green chemistry.

Finally, a (bio)sensor has been developed using the enzyme glucose oxidase (GOD), based on a 2Au/3Pd-NP@rGO nanocomposite. Studying the catalytic effect that bimetallic Au and Pd NPs have upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, the effect of ascorbic acid's presence in electroanalytical measurements (an interferent present in many biological samples) was studied.

# Capítulo 1

## Introducción General

---





# CAPÍTULO 1

## Introducción General

En los últimos años la nanociencia o nanotecnología ha atraído el interés de los científicos en grandes áreas de la ciencia. La química analítica es una ciencia multidisciplinaria donde la nanotecnología ha adquirido una presencia relevante, gracias a los grandes avances en el desarrollo y descubrimiento de nuevos materiales, que han resultado ser muy útiles en el campo de los sensores químicos.<sup>1</sup> En este sentido el uso de nanomateriales en la fabricación de sensores electroquímicos ofrece una amplia mejora de sus propiedades electroquímicas y aporta numerosos beneficios, haciendo posible afrontar retos y demandas cada vez más exigentes de la sociedad. La continua búsqueda de nuevos sensores y biosensores que ofrezcan mejores propiedades analíticas se centra fundamentalmente en una mejora de la respuesta electroquímica.<sup>2</sup> Esto es posible fundamentalmente, al desarrollo de materiales transductores basados en micro/nano estructuras, compatibles con elementos de carácter biológico que hacen posible su aplicación en diferentes áreas como la biomedicina, el medioambiente y la industria alimentaria.<sup>3</sup>

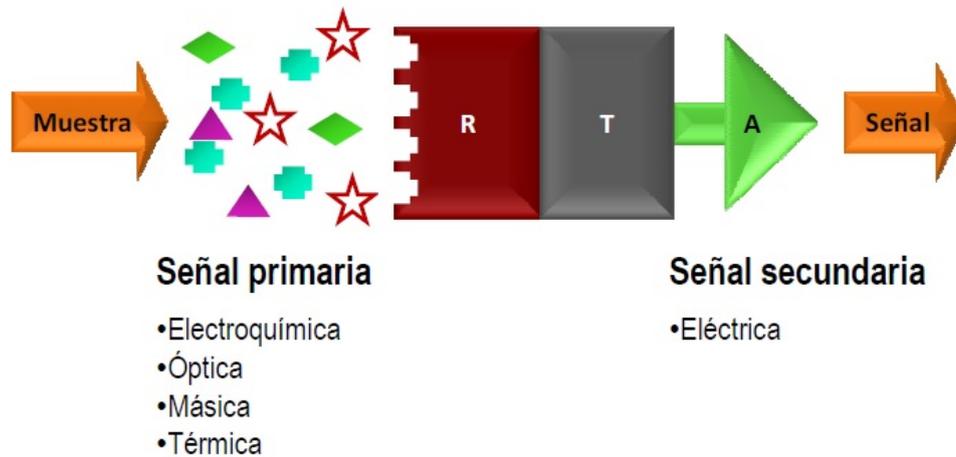
En este campo de los sensores electroquímicos, y de forma particular, los sensores voltamperométricos, el concepto de nanocompuesto. Generalmente, un material nanocompuesto puede ser definido como el resultado de combinar dos o más materiales en fase sólida, donde, al menos una de las partes constituyentes forma parte de la escala de dimensión nanométrica.<sup>4,5</sup> Adicionalmente, cada uno de los componentes de estos materiales compuestos conserva su integridad física individual, a la vez que el material resultante de la combinación de los componentes adquiere nuevas propiedades físicas y mecánicas, y en el caso de los sensores químicos, nuevas propiedades electroquímicas muy relevantes.<sup>6</sup> Actualmente, diferentes materiales carbonáceos se están utilizando en

el desarrollo de nuevos materiales nanocompuestos, para su posterior utilización en el desarrollo de nuevos electrodos con ventajas electroquímicas excepcionales.<sup>6,7</sup> Por este motivo, el uso de nanoestructuras carbonáceas en el desarrollo de nuevos nanomateriales es actualmente un campo de investigación muy importante, que continuamente está ofreciendo grandes avances dentro del área de la química analítica.<sup>8,9</sup> Concretamente, los nanocompuestos basados en materiales conductores dispersos en una matriz polimérica han dado lugar a importantes avances dentro de la electrónica y la electroquímica.<sup>8,10-12</sup>

El grafito, los nanotubos de carbono y el grafeno entre otros, son materiales que pueden ser utilizados en la construcción de nanocompuestos, utilizando estos como fase conductora dispersa en otra fase polimérica y de naturaleza aislante.<sup>13-15</sup> Estos materiales aportan importantes características físicas, mecánicas y electroanalíticas a los sensores desarrollados, como la facilidad de renovar periódicamente la superficie de los electrodos, o la baja corriente de fondo o residual. Desde el primer aislamiento de una sola lámina de grafeno por Andre Geim y Konstantine Novoselof,<sup>16</sup> este material ha sido extensamente estudiado y utilizado para la construcción de sensores debido a sus extraordinarias propiedades electrónicas y mecánicas. Pero, el uso de óxido de grafeno reducido viene dándose desde mucho antes. Este material posee excelentes propiedades electroquímicas debido a los grupos oxidables que contiene, propios del método de síntesis utilizado. A diferencia del grafito, el óxido de grafeno reducido (rGO) puede ser funcionalizado con un gran número de materiales, como nanopartículas, enzimas y otros agentes biológicos de reconocimiento molecular, haciendo a este material en una gran alternativa para la construcción de sensores y biosensores dentro de la química analítica.

### 1.1 Sensores Químicos

Un sensor químico, es un dispositivo capaz de transducir la información química de una muestra en una señal analítica útil. Los sensores químicos están compuestos por dos componentes básicos. El primero es un elemento de reconocimiento (receptor), y un transductor sobre el que se encuentra directamente conectado o integrado el primero.



**Figura 1.1** Esquema del funcionamiento de un sensor químico. El analito es reconocido por el sistema de reconocimiento de forma selectiva (R). La señal primaria es convertida en una señal eléctrica por el transductor (T) y, posteriormente, esta señal es amplificada (A) y procesada en la forma deseada.

El receptor interactúa selectivamente con la información química presente en la muestra y la convierte en una señal reconocible por el transductor, que, a su vez, transforma esta señal primaria en una señal secundaria útil (Figura 1.1). Dependiendo del tipo de receptor y transductor los sensores pueden ser clasificados de diferentes maneras.<sup>17</sup>

Dependiendo del receptor se pueden diferenciar tres tipos de sensores:

- **Físicos:** No hay reacciones químicas involucradas en la detección, es decir, solo hay un cambio en una propiedad física. Un ejemplo son los sensores piezoeléctricos los cuales son capaces de detectar cambios de masa cuando se les aplica una presión exterior.
- **Químicos:** La señal proviene de una reacción química. Por ejemplo, de la interacción entre ionóforos e iones produciendo un cambio de potencial.
- **Biológicos:** El receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, etc., que interactúa con una molécula de forma muy selectiva, dando lugar a reacciones bioquímicas que provocan cambios en las concentraciones de las especies involucradas, susceptibles de generar una información analítica útil.

Siguiendo la normativa de la IUPAC, los sensores químicos se pueden clasificar dependiendo del método de transducción que utilicen.<sup>18</sup> Se define transducción, como el fenómeno que ocurre en la superficie de un transductor que implica la transformación de la energía o señal primaria, propia o generada en un sistema químico, en una señal secundaria capaz de ser procesada, dando lugar a una información analítica útil. Esta señal secundaria acostumbra a ser del dominio eléctrico, y tiene como finalidad poder extraer información analítica de nuestra muestra a analizar.

De entre los tipos de transductores que se pueden encontrar, los electroquímicos son los que han recibido una mayor atención y un mayor desarrollo dentro del campo de los sensores químicos. Esto es debido a su fácil construcción, tanto instrumental como conceptual. El proceso electroquímico tiene lugar en la interfase electrodo-disolución, sin la necesidad de tener que interactuar con todo el volumen de muestra. Se ha de destacar que estas técnicas no requieren de una instrumentación sofisticada, por lo que el coste de análisis se reduce considerablemente. Dependiendo del mecanismo de transducción se pueden cinco tipos de sensores.

- **Sensores ópticos:** Transforman cambios de fenómenos ópticos, resultantes de la interacción del analito y el receptor. Las más habituales son absorbancia, reflectancia, luminiscencia, fluorescencia e índice de refracción.
- **Sensores electroquímicos:** Miden el efecto de la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
- **Sensores másicos:** Transforman un cambio de masa sobre una superficie modificada en un cambio de una propiedad del material transductor piezoeléctrico de soporte.
- **Sensores térmicos:** Transforman el efecto calorífico de la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica.

Los métodos electroquímicos se pueden clasificar, a su vez, en función del tipo de señal utilizada para cuantificar la medida. Estos son principalmente los métodos potenciométricos y amperométricos. Los primeros, también llamados electrodos selectivos de iones (ESIs) o *ion-selective electrode (ISE)*, y los transistores de efecto de campo sensibles a iones, ISFET por sus siglas en inglés (*ion-sensitive field effect transistors*), miden la diferencia de potencial generada fruto de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Los métodos voltamperométricos miden la

intensidad de corriente generada por una reacción de transferencia electrónica derivada de la aplicación de un potencial. Los métodos voltamperométricos pueden operar midiendo la intensidad de corriente generada al variar el potencial dentro de un intervalo preestablecido o a un potencial fijo. Cuando se trabaja a un potencial fijo se denominan técnicas amperométricas.<sup>19,20</sup>

## 1.2 Sensores amperométricos

Dentro del campo del electroanálisis, los estudios del químico polaco Jaroslav Heyrovský dieron un gran impulso a las técnicas voltamperométricas, por cuyo avance recibió el Premio Nobel de Química en 1959. Estas técnicas permiten la determinación y cuantificación de muchas sustancias inorgánicas (principalmente iones inorgánicos) y orgánicas, siempre que estas sean susceptibles de ser oxidadas o reducidas (electroquímicamente) en la superficie del electrodo.

Las técnicas amperométricas presentan un gran abanico de ventajas para ser utilizadas dentro el campo de los sensores químicos. Másson *et. al* citó algunas como:<sup>21</sup>

- Existe una relación directa entre la concentración de la especie que se quiere analizar (analito) y la intensidad de corriente, que es la señal analítica observada. Esta relación deriva en una mayor sensibilidad de las técnicas amperométricas respecto a las técnicas potenciométricas, en la que la señal analítica medida (potencial) depende del logaritmo de la actividad del analito. Consecuentemente, esto conlleva generalmente a mejores límites de detección.
- La reacción electroquímica se da lugar en la superficie del electrodo por lo que no influye el volumen total de la muestra analizada.
- Las técnicas amperométricas, utilizan instrumentación robusta, simple, y de bajo coste de fabricación.
- La señal analítica que se mide (intensidad) es fácilmente procesable.
- Estas técnicas presentan un amplio intervalo dinámico de respuesta (de 4 o 5 décadas de concentración). Esto permite la aplicación de dichas técnicas en

sistemas de monitorización de la señal analítica, utilizados en el control y optimización de procesos más o menos automatizados.

- No son susceptibles de interferencias físicas como pueden ser el color, la turbidez o la viscosidad. Lo cual simplifica el proceso analítico pudiendo evitar el tratamiento previo de la muestra.
- Los materiales utilizados para la construcción de electrodos pueden ser simples, fácilmente accesibles y de bajo coste.

Estos sistemas electroquímicos se basan en el transporte de carga proveniente de especies electroactivas, a través de diferentes interfases físicas como un conductor electrónico (electrodo) y un conductor iónico (electrolito). Existen dos tipos de procesos que pueden ocurrir en las interfaces electrodo/disolución en presencia de una especie electroactiva. La transferencia electrónica a través de la interfase electrodo/disolución provoca la reducción o la oxidación de la especie electroactiva dependiendo de en qué forma se encuentre esta. Estas reacciones están gobernadas por la ley de Faraday, es decir, la cantidad de reacción química  $N$  (mol) causada por una corriente eléctrica  $I$  (A) (Ecuación 1.1) es proporcional a la cantidad de electricidad que ha pasado  $Q$  (C), esta corriente se denomina corriente de tipo faradaico y es la más importante desde el punto de vista analítico. La intensidad de corriente  $i$  (A) medida corresponde a la transducción de la velocidad de la reacción electroquímica  $v$  (mol/s) en la interfase del electrodo. De esta manera se tiene que:

$$I(A) = \frac{dQ}{dt} \text{ (C/s)} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

$$\frac{Q}{nF} = \frac{(C)}{(C/mol)} = N \text{ (moles electrolizados)} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

$$v(\text{mol/s}) = \frac{dN}{dt} = \frac{I}{nF} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Cabe destacar que al ser reacciones del tipo heterogéneo, las velocidades de reacción dependen del área electroactiva del electrodo  $A$  (cm<sup>2</sup>) y la densidad de corriente,  $j$  (A/cm<sup>2</sup>).

$$v(\text{mol /s} \cdot \text{cm}^2) = \frac{i}{nFA} = \frac{j}{nF} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

La velocidad de reacción también dependerá de las condiciones de difusión, migración y convección. La corriente de migración, que es el resultado de un transporte de masa debido a un gradiente eléctrico tras aplicar un potencial entre dos electrodos, se hace constante e independiente de la concentración del analito adicionando un electrolito soporte en la celda electroquímica. La corriente de convección, que se debe al movimiento de las cargas por una fuerza mecánica o gradiente térmico en la disolución, puede controlarse aplicando una agitación constante y moderada en la celda electroquímica, o bien minimizándola trabajando con soluciones no agitadas.<sup>22</sup> La corriente de difusión es el resultado del transporte de masa del analito debido a un gradiente de concentración que se crea entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución. Esta difusión está directamente relacionada con el tiempo cuando las medidas se realizan en disoluciones no agitadas (corrientes de convección mínimas), circunstancias que limitan este tipo de experimentos. Si la respuesta analítica se mide en disoluciones estáticas la corriente de intensidad  $I$  decrece con el tiempo, siguiendo la ecuación de Cottrell (Ecuación 1.5).<sup>23</sup>

$$i = nFA \sqrt{\frac{D_a}{t\pi}} C_a \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Donde,  $n$  es el número de electrones involucrados en la reacción electroquímica,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  el área electroactiva del electrodo,  $D_a$  el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la disolución,  $t$  es el tiempo durante el cual se produce la reacción y  $C_a$  es la concentración de la especie electroactiva en la disolución. Observando esta ecuación, se puede deducir que la intensidad decrece a medida que avanza el tiempo de reacción, dando lugar a intensidades muy bajas con el tiempo.<sup>22</sup>

Para conseguir intensidades más altas y proporcionales a la concentración de analito es preferible la utilización de técnicas hidrodinámicas en las cuales se fuerza la convección, utilizando, por ejemplo, un electrodo en forma de disco rotatorio o simplemente agitando la disolución. En estas medidas el transporte de masa (que es más rápido) es una combinación de dos mecanismos de transporte la convección y la difusión. En estas circunstancias se forma una capa de difusión estática o capa de Nernst, en la superficie del electrodo de un grosor  $d$ , que dependerá drásticamente de la velocidad de agitación de la disolución. Así, se consigue que el transporte de masa hacia la superficie del electrodo este determinado solamente por la difusión en esta capa. Se obtiene de esta manera, un estado estacionario en un tiempo breve, en el que el transporte de masa es

estable y el valor final de la intensidad depende de la concentración del analito en el seno de la disolución (Ecuación 1.6). Esta expresión se puede simplificar según la ecuación 1.7

$$i = \frac{nFADaCa}{d} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

$$i = KC_a \quad \text{Ecuación 1.7}$$

Donde, **K** es la constante que incluye el número de electrones intercambiados, la constante de Faraday, el área electroactiva del electrodo y el coeficiente de difusión. Para poder utilizar la ecuación 1.7, se asume que la distribución del analito en el seno de la disolución es uniforme hasta la capa de difusión ( $C_a$ ), y que la concentración de analito en la superficie del electrodo ( $C_0$ ) es cero cuando se aplica un potencial adecuado en el que se alcanza la polarización total del electrodo.

En determinadas circunstancias, puede existir un amplio intervalo de potenciales donde no ocurran reacciones de transferencia electrónica entre la interfase electrodo/disolución, ya sea porque termodinámica o cinéticamente no estén favorecidas. Este hecho repercute en la estructura de cargas en la superficie del electrodo. La corriente de carga o de condensador, es la corriente requerida para restablecer la doble capa eléctrica formada en la interfase electrodo/disolución. Esta corriente, de tipo no faradaico, siempre presente, aumenta con el área electroactiva del electrodo y el potencial de trabajo aplicado, y es un inconveniente desde el punto de vista analítico, pero decrece con el tiempo y es despreciable en medidas amperométricas en las que se trabaja a un potencial fijo.

### 1.3 Materiales usados en la construcción de sensores amperométricos

Una característica indispensable que deben cumplir los materiales empleados en el desarrollo de sensores amperométricos es que sean conductores, a la vez de ser químicamente inertes.<sup>11</sup> Las medidas amperométricas están altamente influenciadas por la naturaleza del material sensor, así como las dimensiones y la geometría del material que forma la superficie del electrodo. Las principales características que deben presentar

estos materiales, desde el punto de vista analítico, son una alta sensibilidad, mínima resistencia a la transferencia de carga y una elevada relación señal/ruido. La elección del material conductor para la construcción de sensores amperométricos vendrá principalmente influenciada por el comportamiento redox de la especie electroactiva (analito) y la corriente residual (no faradaica) en la región del potencial de trabajo. Otros factores a tener en cuenta, en el desarrollo de materiales conductores aplicados en la construcción de sensores amperométricos, son la ventana de potencial de trabajo útil electrodo, la conductividad del material conductor utilizado en la construcción del electrodo, la reproducibilidad de la superficie del sensor, las propiedades mecánicas, el coste de fabricación de este, la disponibilidad de los materiales que lo componen y la toxicidad de los mismos, para una correcta manipulación sin perjuicio de la salud del usuario.

Existen una amplia gama de materiales conductores de la electricidad que pueden ser utilizados en el desarrollo de sensores amperométricos. El mercurio, por ejemplo, es un material ampliamente utilizado en las técnicas polarográficas por las numerosas ventajas que aporta. Presenta un sobrepotencial para la reducción del  $H^+$  a hidrógeno elevado, una amplia ventana de potencial catódico (comparado con el de otros electrodos sólidos), una alta reproducibilidad y permite construir electrodos de superficie fácilmente renovable.

No obstante, presenta diversos inconvenientes como, su elevada toxicidad, corrientes no faradaicas relativamente elevadas y limitaciones de trabajo en el rango de potenciales anódicos.

Otro tipo de materiales altamente utilizados son los electrodos sólidos, que a diferencia de los electrodos de mercurio tienen una gran ventana de trabajo en rangos de potenciales anódicos. Entre los materiales sólidos más utilizados, para la construcción de sensores amperométricos, están el platino, el oro y los materiales carbonáceos; siendo estos últimos de gran importancia, actualmente en el desarrollo de materiales compósitos.<sup>2,24</sup> Otros materiales como el cobre, la plata o el níquel también pueden ser utilizados en la construcción de sensores electroquímicos, pero sus aplicaciones son mucho más limitadas. A diferencia de los electrodos de mercurio, los materiales carbonáceos, presentan una superficie heterogénea respecto a la actividad electroquímica, fácilmente alterable con el uso, por lo que este tipo de electrodos de superficie sólida, requieren un

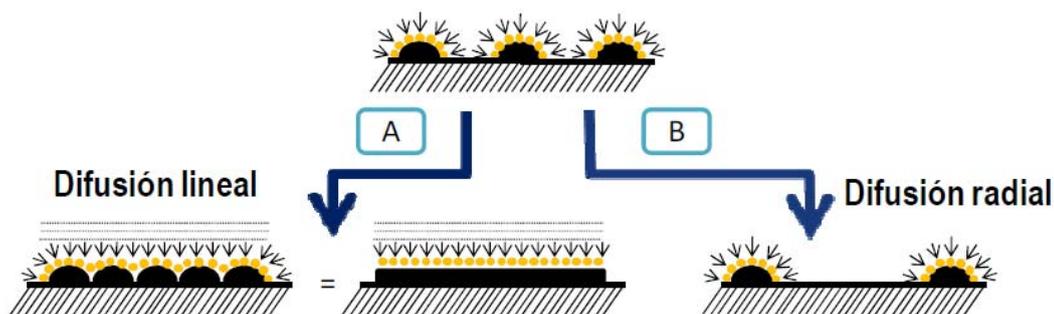
proceso de pulido frecuente para poder obtener medidas significativamente reproducibles.<sup>25</sup>

En los últimos años, con el objetivo de mejorar las características electroquímicas y la selectividad de los sensores amperométricos, se ha realizado un importante esfuerzo por modificar la superficie de estos sensores empleando un gran número de estrategias.<sup>26-28</sup> Estos electrodos modificados, incorporan ciertas sustancias, ya sea sobre la superficie del electrodo o en la matriz del material sensor, modificando de forma extraordinaria las características electroanalíticas de estos sensores.<sup>29</sup> Estas modificaciones se pueden llevar a cabo, físicamente a través de la incorporación de catalizadores electroquímicos, químicamente con mediadores redox o biológicamente para el desarrollo de biosensores. Todos estos tipos de sensores abren la vía a un sinfín de aplicaciones analíticas y de diferentes dispositivos de detección. La modificación de los materiales sensores permite desarrollar (bio)sensores amperométricos con importantes características electroquímicas, como son el aumento de velocidad de transferencia de carga, el control del ruido de la señal, la acumulación preferencial o permeabilidad de la membrana selectiva. Todas estas propiedades se traducen analíticamente en un aumento de la sensibilidad, la selectividad y la estabilidad del dispositivo sensor.

Otros factores, a tener en cuenta, son la geometría y las dimensiones de la superficie del electrodo. En la bibliografía existen numerosos trabajos donde se destacan las virtudes de los electrodos de pequeñas dimensiones con áreas electroactivas muy reducidas. Estos dispositivos reciben el nombre de microelectrodos.<sup>30</sup>

Desde el punto de vista electroquímico, los microelectrodos presentan numerosas ventajas respecto los macroelectrodos, como puede ser una mayor relación señal/ruido, menores límites de detección y capacidad de detectar especies electroactivas en medios altamente resistivos, como en disolventes orgánicos o en medios con ausencia de electrolito soporte. Los microelectrodos presentan constantes de celda muy bajas (RC) lo que conlleva a realizar medidas con tiempos de vida muy cortos (productos intermedios de reacción) y la medida de constantes de velocidad muy altas. El principal inconveniente que presentan los microelectrodos son las bajas intensidades de corriente que generan, lo cual hace necesario disponer de una instrumentación muy sofisticada con amplificadores de bajo ruido.

Para poder solucionar este problema se desarrollaron los haces de microelectrodos. Estos electrodos están contruidos mediante una fase conductora, la cual se distribuye de manera ordenada o desordenada en la superficie del electrodo o en el interior de una matriz aislante. Los haces de microelectrodos, a pesar de tener todas las ventajas de los microelectrodos, tienen la posibilidad de generar intensidades de corriente mucho mayores que sus antecesores.<sup>31,32</sup> Esta propiedad viene dada por la manera en que se distribuye el material conductor en las proximidades de la superficie del electrodo. Existen dos tipos de difusión en estos casos: difusión radial y difusión lineal (Figura 1.2). La difusión radial es la que se obtiene generalmente en la superficie de los microelectrodos, o en una distribución de haces de microelectrodos óptimamente separados, lo que conlleva a una elevada transferencia de masa. Esta característica viene dada por la distribución y la geometría del propio electrodo, donde la masa de analito no llega de forma perpendicular, sino que lo hace de forma radial. A este fenómeno se le llama efecto *edge* y favorece un incremento de masa sobre la superficie del electrodo sin variar significativamente el ruido asociado a la señal, obteniendo, consecuentemente, un aumento de la relación señal/ruido.<sup>32-35</sup> La difusión lineal tiene lugar en electrodos de mayores dimensiones (macroelectrodos), donde el analito (especie electroactiva) difunde linealmente desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. Este tipo de difusión también puede ocurrir en haces de microelectrodos donde las partículas conductoras en la superficie no están lo suficientemente separadas. Desde el punto de vista electroquímico es necesario que, para que un haz de microelectrodos conserve todas sus ventajas analíticas, los diferentes microelectrodos o partículas conductoras que componen el electrodo, estén lo suficientemente separadas y se comporten de manera independiente desde el punto de vista difusional. Se considera, por lo tanto, que un haz de microelectrodos es difusionalmente independiente, cuando las partículas que lo forman están lo suficientemente separadas entre sí y, al mismo tiempo, la velocidad de barrido es suficientemente lenta para que la capa de difusión formada sobre cada electrodo no se superponga con la de otros microelectrodos.

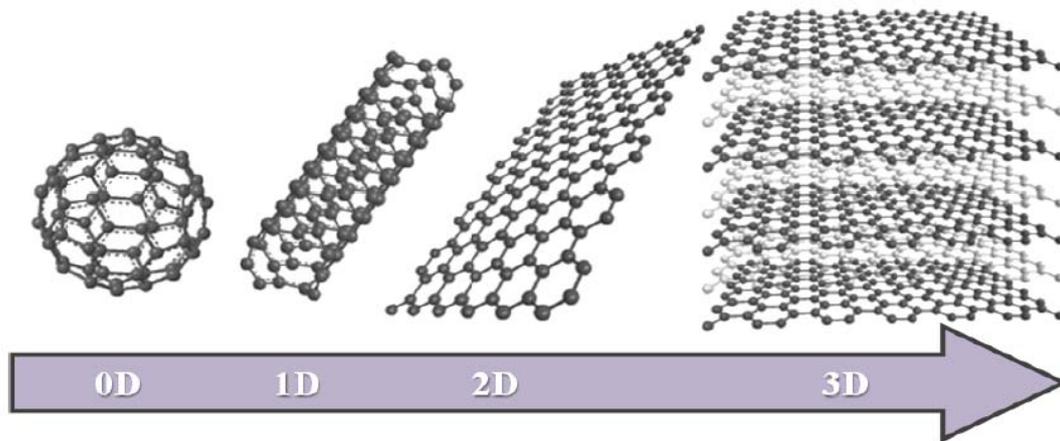


**Figura 1.2** Esquema de los dos tipos de difusión lineal (A) y radial (B) que se pueden encontrar en un haz de microelectrodos.

## 1.4 Sensores electroquímicos basados en óxido de grafeno reducido

Grafeno es el nombre que se le da a una lámina dimensional de carbonos con hibridación  $sp^2$ .<sup>16,36</sup> Es una red en forma de panal y constituye el bloque básico para formar otros alótopos del carbono. Estas láminas de grafeno se pueden apilar formando grafito (estructura 3D), enrollarse para formar nanotubos de carbono (1D) o envolverse para formar fullerenos (0D) (Figura 1.3).

La alta conjugación de electrones  $\pi$  que contienen estas láminas, confieren al grafeno una extraordinaria conductividad térmica, eléctrica y estabilidad mecánica, lo que hace de que este material sea de gran interés para la comunidad científica.<sup>37-40</sup> Una sola lámina de grafeno muestra un carácter de semiconductor o semimetal en el cual el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) está en contacto con el orbital desocupado de menor energía (LUMO) y, cuantas más láminas de grafeno se apilen, estos orbitales se superponen adquiriendo un comportamiento metálico en el material.<sup>36,41</sup> Debido a la gran área superficial (valor teórico de  $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ ) que muestra respecto al volumen, estas estructuras 2D presenta una alta sensibilidad analítica, lo que hace de este material un gran candidato en el desarrollo materiales nanoestructurados para ser utilizados como sensores.<sup>42-46</sup>



**Figura 1.3** Diferentes formas  $sp^2$  del carbono. Fullerenos (0D), nanotubos de carbono (1D), grafeno (2D) y grafito (3D).

El grafeno tiene un módulo de Young de  $\sim$  TPa y una fuerza de 130 GPa, siendo el material más fuerte medido hasta el momento. Estas propiedades excepcionales, hacen de este material una alternativa ideal para ser utilizado en una gran variedad de aplicaciones como pueden ser sensores, baterías, supercapacitores, células de combustible y nanocompuestos, entre otros.<sup>47</sup> Se han realizado un gran número de estudios para poder aislar y caracterizar una lámina de grafeno, pero no fue hasta el 2004 cuando Konstantine Novoselov y Andre Geim, fueron capaces de aislar una única lámina de grafeno partiendo de grafito.<sup>16,48</sup> Este hecho provocó un interés considerable en materiales 2D.<sup>49</sup> El grupo liderado por Geim fue capaz de aislar una lámina de grafeno y estabilizarla, en un substrato soporte, mediante una exfoliación mecánica del grafito utilizando una lámina de celo. Este hallazgo permitió observar su efecto cuántico Hall a temperatura ambiente, determinar su alta movilidad electrónica, y hasta la primera detección de una sola molécula adsorbida sobre la superficie de este material.<sup>36,41,50</sup> No obstante, este método no permite la síntesis de grafeno a gran escala, por lo que otros métodos de síntesis se han desarrollado y siguen estando en estudio, con el objetivo de conseguir un grafeno de alta calidad y pureza, con una producción masiva y un coste asequible para poder ser utilizado en aplicaciones industriales.<sup>51</sup>

La síntesis del grafeno puede clasificarse en dos métodos diferentes: *top-down* y *bottom-up*. Los métodos *top-down* incluyen la rotura de láminas de grafito hasta llegar a láminas de grafeno, mientras que los métodos *bottom-up* utilizan la síntesis de grafeno partiendo

de otras fuentes de carbono hasta formar una lámina.<sup>52-54</sup> Entre los métodos más utilizados se encuentra la exfoliación mecánica de grafito u óxido de grafito, *chemical vapor deposition* (CVD) o crecimiento epitaxial.<sup>55,56</sup>

El método de Hummers constituye una opción en la producción de grafeno.<sup>57</sup> Este método consiste en la oxidación química de grafito originando óxido de grafito. Inicialmente el óxido de grafito fue sintetizado utilizando clorato de potasio con una mezcla de grafito/HNO<sub>3</sub>/NaNO<sub>3</sub>, el cual es conocido como método de Staudenmaier y Brodie. Posteriormente, se desarrolló el método de Hummers, el cual utiliza KMnO<sub>4</sub> y NaNO<sub>3</sub> disueltos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para permitir la oxidación más efectiva del grafito formando óxido de grafito. Este método reduce el tiempo de reacción respecto al anterior y también reduce la emisión de gases tóxicos. En la literatura se pueden encontrar diferentes modificaciones del método de Hummers, como es la sustitución del NaNO<sub>3</sub> debido a los gases que se generan durante la síntesis.<sup>52,58-61</sup> Estos métodos forman una estructura laminada, conteniendo en sus planos basales grupos hidroxilos y epoxis, y grupos carbonilos en los bordes.<sup>62</sup> Esto confiere al óxido de grafito un carácter hidrofílico, y la presencia de estos grupos hace también que aumente la distancia interlaminar en la estructura 3D, reduciendo de esta manera las fuerzas de Van der Waals, con lo que es posible obtener láminas de óxido de grafeno.<sup>63</sup> Este óxido de grafeno muestra significantes diferencias electrónicas con el grafeno obtenido mediante exfoliación mecánica con lo que es necesario una reducción de estos grupos con el objetivo de recuperar las propiedades del grafeno. Este material, al que llamamos óxido de grafeno reducido (rGO), contiene un gran número de defectos en sus planos, lo que hace este material perfecto para ser utilizado con fines electroquímicos.<sup>64-66</sup>

El CVD es también un método de fabricación de grafeno con el cual se producen unas láminas de grafeno de una alta calidad.<sup>67</sup> El método consiste en calentar una fuente de carbono hasta formar un vapor de este, depositándolo posteriormente sobre un sustrato metálico. Este sustrato metálico actuará como catalizador en el crecimiento del grafeno. Los metales más utilizados como sustratos son el Ni, Fe, Co, Pt y Cu. El proceso de crecimiento se puede dividir en tres etapas: 1) la difusión del carbono en el metal a una determinada temperatura, 2) el desprendimiento del carbono de la lámina metálica durante el proceso de enfriado, y 3) la formación de láminas de grafeno sobre la superficie.<sup>68</sup>

El crecimiento epitaxial, es un método de fabricación utilizado para producir grafeno a gran escala para procesos de microfabricación. Este método puede incorporar CVD como proceso para depositar el grafeno en el sustrato con el compromiso que el crecimiento epitaxial utiliza sustratos aislantes, generalmente SiC. En la Tabla 1.1 se detallan las diferentes propiedades obtenidas del grafeno según el método de síntesis utilizado.

**Tabla 1.1** Características del grafeno obtenido según los diferentes métodos de síntesis.

	Conductividad eléctrica	Área superficial	Químicamente inerte	Tiempo de fabricación	Volumen
<b>Método de Hummers</b>	✓	x	✓	✓	✓
<b>Exfoliación de óxido de grafito</b>	✓	x	✓	✓	x
<b>CVD</b>	✓	✓	✓	x	✓
<b>Crecimiento epitaxial</b>	✓	✓	✓	✓	✓

## 1.5 Grafeno funcionalizado con nanopartículas metálicas

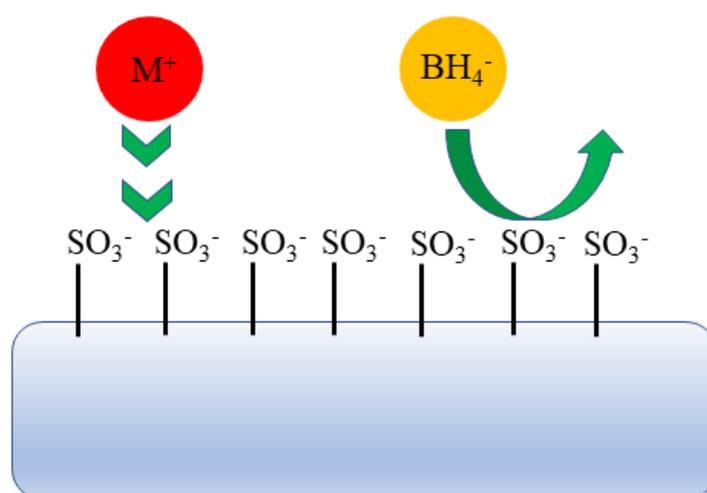
Recientemente, la nanotecnología ha resultado ser uno de los ámbitos más excitantes en la química analítica.<sup>69</sup> En este contexto existen un gran número de nanomateriales que pueden ser utilizados en aplicaciones analíticas. Las NPs metálicas debido a su pequeño tamaño, normalmente en el rango de 1-100 nm, presentan unas únicas propiedades químicas, físicas y electrónicas que las diferencian de sus materiales en estado *bulk*, y que pueden ser aprovechadas para mejorar las propiedades de sensores electroquímicos.<sup>70-74</sup> Existen distintos tipos de NPs que pueden tener diferentes interacciones con sistemas bioquímicos, que las hacen aptas para el desarrollo de sensores enzimáticos, inmunosensores y sensores de DNA.<sup>75</sup> Las NPs metálicas presentan una excelente conductividad y propiedades catalíticas que las hacen especialmente útiles para aumentar la transferencia electrónica entre los centros redox de ciertas proteínas y, catalizar reacciones electroquímicas.<sup>76-79</sup> Frecuentemente, las NPs de óxidos metálicos son utilizadas con el objetivo de inmovilizar biomoléculas debido a su biocompatibilidad, mientras que las NPs semiconductoras (quantum dots) son utilizadas como marcadores

en el análisis electroquímico. Dentro de las diferentes propiedades que presentan las NPs en sistemas electroquímicos se pueden destacar: 1) la inmovilización de biomoléculas en su superficie; 2) la catálisis de reacciones electroquímicas; 3) el aumento de la transferencia electrónica; 4) el marcaje de biomoléculas, y 5) el uso de estas como reactivos.<sup>80,81</sup> Debido a la alta área superficial con respecto al volumen, las NPs pueden adsorber diferentes biomoléculas durante el proceso de desarrollo de los biosensores, aumentando el número de biomoléculas en la superficie y, consecuentemente, aportando una mayor sensibilidad al biosensor final. Entre todas las NPs metálicas, las de Au son probablemente las más usadas.<sup>1,82</sup> Por ejemplo, se ha demostrado que se pueden inmovilizar biomoléculas sobre la superficie de NPs de Au a través de enlaces covalentes debido a los grupos amina de las cisteínas que contienen los residuos de proteínas<sup>82</sup>. El uso de NPs metálicas con propiedades catalíticas en sistemas electroquímicos, puede disminuir los potenciales de trabajo de muchas reacciones electrónicas. Destacar, por ejemplo, el uso de NPs de Au sobre un electrodo de Pt que redujo el potencial de trabajo en la detección del NO en 250 mV. Teniendo en cuenta la catálisis selectiva, Ohsaka *et al.* desarrollaron un sensor para la detección de dopamina en presencia de ácido ascórbico, en que el potencial de oxidación del ácido ascórbico disminuía debido a la presencia de nanopartículas de Au, facilitando de esta manera, la separación de los potenciales de oxidación, aumentando la selectividad del sensor.

Mientras que los enzimas frecuentemente carecen de una conexión eléctrica directa con el electrodo, el uso de NPs puede aumentar la transferencia electrónica debido a las propiedades eléctricas de estas. Un ejemplo es el trabajo desarrollado por Willner *et al.* en el que funcionalizaron NPs de Au con un dinucleótido y glucosa oxidasa, depositado sobre una monocapa tiolada asociada a un electrodo de Au. El resultado mostró una rápida transferencia electrónica entre la enzima y la superficie del electrodo gracias a la ayuda de las NPs de Au. El uso de marcadores de biomoléculas, como pueden ser antígenos, anticuerpos DNA con NPs juega un importante rol en el desarrollo de sensores electroquímicos.<sup>29</sup>

## 1.6 Síntesis intermatricial de rGO-nanocompuestos con nanopartículas

El intercambio iónico aplicado a la obtención de nanopartículas metálicas corresponde a un tipo de método que puede clasificarse como síntesis intermatricial. Esta técnica ofrece la posibilidad de usar una matriz a modo de molde con el objetivo de controlar el crecimiento de NPs metálicas y evitar la aglomeración de estas en el medio de síntesis (Figura 1.4).



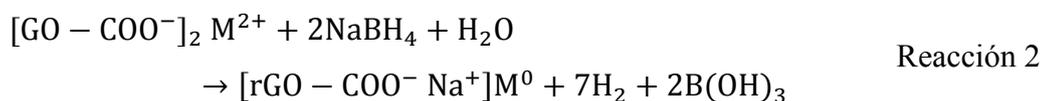
**Figura 1.4** Esquema del proceso de formación de NPs metálicas en el polímero de intercambio catiónico funcionalizado con grupos  $\text{R-SO}_3^-$ .

La primera información publicada sobre la síntesis intermatricial de NPs metálicas utilizando un polímero de intercambio iónico, se remonta a 1949, cuando Mills y Dickinson desarrollaron una resina de intercambio aniónico conteniendo nanopartículas de Cu para la eliminación del oxígeno disuelto en agua.<sup>83</sup>

Por otro lado, se ha de destacar que la estrategia de la síntesis intermatricial se puede aplicar a la funcionalización de materiales carbonáceos, como el óxido de grafeno reducido para obtener  $\text{M-NP}@r\text{GO}$ .

De modo general, esta técnica de síntesis de NPs está basada en dos etapas:

- i. Introducción de un precursor metálico en la matriz soporte, que funcionaliza los grupos activos de la matriz con los iones metálicos o complejos precursores de las NPs. En el caso del GO estos grupos activos son los hidroxilos y grupos carbonilos presentes en sus planos basales (Reacción 1).
- ii. Reducción de los iones metálicos a metal cero-valente dentro de la matriz, usando un agente reductor como puede ser NaBH<sub>4</sub> o ácido ascórbico. Durante este proceso se reduce *in-situ* el GO a rGO recuperando así sus propiedades eléctricas, y formándose simultáneamente, las NPs metálicas en su superficie, obteniendo de esta manera un material híbrido (Reacción 2).



Esta técnica tiene las ventajas de las propiedades del intercambio iónico de la matriz soporte (*e.g* resinas sulfónicas, GO-COOH...) idóneas para poder obtener una carga inicial del metal y posterior proceso de reducción *in-situ* del GO y del metal precursor. Este hecho permite estabilizar las NPs metálicas disminuyendo la posibilidad de aglutinación y reoxidación de las mismas. Además, esta técnica permite obtener una buena distribución de las NPs sobre la superficie donde se inmovilizan, por lo que se consigue una distribución homogénea en la matriz y una alta uniformidad de tamaño en las NPs obtenidas.<sup>84,85</sup>

## 1.7 Nanocompuestos de grafeno para el desarrollo de sensores electroquímicos

Un nanocompuesto se define como el resultado de la combinación de dos o más materiales de diferente naturaleza, donde al menos una de las partes está en la escala nanométrica. Estos materiales no pierden sus propiedades individuales, pero otorgan nuevas características físicas, químicas y mecánicas al material formado.<sup>8,25</sup>

En el caso de nanocompuestos conductores, este material está formado generalmente por un polímero aislante que está en mayor porcentaje denominado matriz y un material conductor.<sup>86</sup> La matriz actúa como fase aislante y es la encargada de aglutinar a todas las demás fases que conforman el nanocompuesto, proporcionando estabilidad tanto física como mecánica al material nanocompuesto resultante. Las características finales del nanocompuesto dependen en gran medida de la habilidad de dispersar el material conductor dentro de la matriz. Una buena dispersión, mejora las propiedades mecánicas del nanocompuesto y proporciona una gran homogeneidad al material, haciéndolos idóneos para ser utilizados posteriormente con fines analíticos.<sup>87</sup> Existen diferentes materiales para ser utilizados como matriz, como pueden ser polímeros amorfos, cristalinos, termoplásticos, polímeros conjugados, etc. Una matriz blanda durante el proceso de preparación del compuesto facilita la incorporación del material conductor.

Durante la última década, el número de publicaciones que destacan las propiedades eléctricas, térmicas y mecánicas del rGO, para ser utilizado como material conductor en nanocompuestos, ha aumentado significativamente.<sup>27,87-89</sup> Esto se debe a las extraordinarias propiedades que ofrece el grafeno para ser utilizado en la construcción de (bio)sensores, como son su alta conductividad eléctrica, su bajo coste de producción y la posibilidad de funcionalizarlo con diferentes NPs en función de las aplicaciones analíticas. Los nanocompuestos poliméricos pueden presentar diferentes morfologías y diferentes propiedades electroanalíticas dependiendo del material conductor usado (nanotubos de carbono, grafito, grafeno, entre otros).

Los nanocompuestos conductores se pueden clasificar según la distribución de las partículas conductoras en el seno de la matriz polimérica. Generalmente se pueden agrupar en dos bloques: electrodos compósitos ordenados y electrodos compósitos aleatorios. Los electrodos compósitos ordenados, presentan un mayor grado de orden de las partículas conductoras, mientras que los aleatorios las partículas conductoras se encuentran distribuidas de forma aleatoria en el material. No obstante, se usa mayoritariamente el término *array* para denominar un haz de microelectrodos ordenado. Mientras que los sistemas basados en una distribución aleatoria o desordenada se utiliza el término compósito como término genérico.<sup>90</sup>

Uno de los parámetros de calidad más importantes de un sensor electroquímico es que posea un límite de detección bajo, parámetro asociado a una alta relación señal/ruido. La

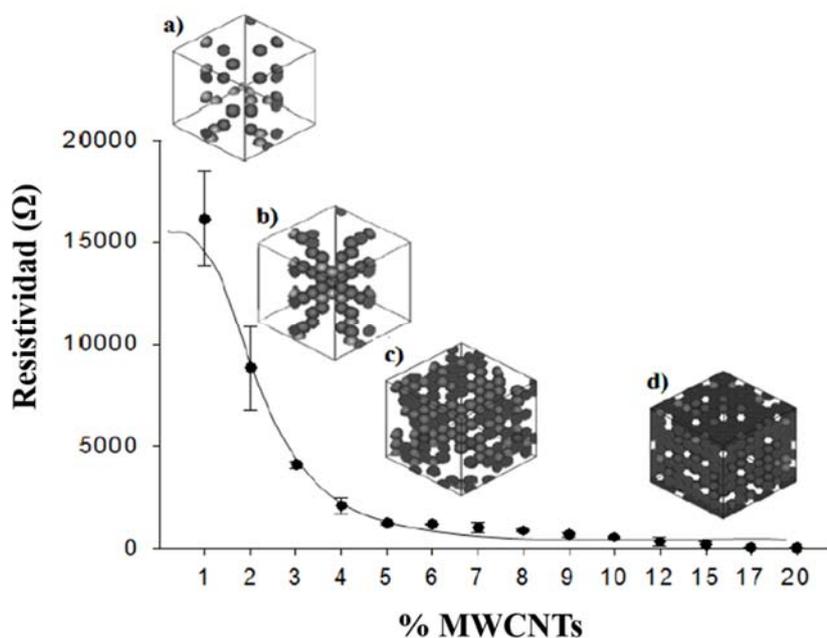
corriente de fondo o ruido en un macrosensor basados en conductores puros, depende fundamentalmente del área electroactiva del electrodo. Un área grande, implica una gran sensibilidad, pero también un ruido elevado. Cuanto menor es el área, menor es la sensibilidad del electrodo, sin embargo, el componente ruido disminuye considerablemente. Los electrodos con áreas electroactivas muy reducidas como los microelectrodos, en los que la difusión radial del analito desde el seno de la solución hacia la superficie del microelectrodo genera un aporte de masa mayor que en el caso de la difusión lineal de los macroelectrodos, siendo el ruido de la señal bastante reducido. Esta difusión no lineal del analito hacia la superficie del electrodo se conoce como efecto *edge*, fenómeno que aumenta considerablemente la relación señal/ruido de este tipo de electrodos. Sin embargo, a pesar de este aumento significativo de la relación señal/ruido, las intensidades de corriente generadas son bastante bajas debido a las dimensiones del electrodo, necesitando equipos más sofisticados para llevar a cabo medidas de intensidades tan pequeñas.<sup>19</sup> Los haces de microelectrodos intentan unificar las ventajas que presenta un microelectrodo (alta relación señal/ruido) y las ventajas de los macroelectrodos (altas intensidades). Así pues, un haz de microelectrodos puede ser percibido como un macroelectrodo formado por un gran número de microelectrodos, en el cual la señal generada será la suma de las intensidades individuales de cada microelectrodo, sin aumentar de forma significativa el ruido de la señal. Para el diseño de un haz de microelectrodos Weber *et al.* mostró que la máxima eficiencia de un *array* de microelectrodos viene dada cuando la distancia interlaminar entre las partículas conductoras es aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ . No obstante, la construcción de estos electrodos es costosa desde el punto de vista tecnológico. Los materiales compuestos se presentan como una alternativa mucho más económica y fácil de preparar. El grado de dispersión de las partículas conductoras en una matriz aislante, intenta mimetizar las características que presentan los haces de microelectrodos.

De este modo, la carga de material conductor dentro de la matriz polimérica aislante influye inherentemente en el comportamiento analítico del electrodo. Esto es debido a que la carga de material conductor influye directamente no sólo en el área electroactiva de la superficie, sino también en la estructura interna del material. La fracción de material conductor ha de ser suficiente como para que las partículas de carbono estén en contacto entre ellas para proporcionar conductividad al compuesto, y no demasiado elevada para evitar una superficie con comportamiento de macroelectrodo 100 % conductor.

En este aspecto, las propiedades eléctricas de los nanocompuestos conductores dependen de la naturaleza de los diferentes componentes que lo forman, su relativa cantidad y la distribución de estos. Una aproximación válida para caracterizar la conductividad eléctrica de estos materiales compuestos es la teoría de la percolación, la cual fue establecida por Hammersley en 1957, pero no fue hasta el 1970 cuando fue utilizada para determinar el comportamiento conductor de los materiales compuestos.<sup>91,92</sup> El parámetro más importante que se puede destacar de esta teoría es el umbral de percolación o *percolation threshold* (PTC), que es el punto en el cual la cantidad de partículas conductoras son suficientes como para asegurar una mínima conductividad. Cuanto mayor sea la carga de material conductor, mayor será la conductividad, hasta llegar a un límite físico a partir del cual, el material compuesto pierde su integridad física y mecánica. En la literatura se pueden encontrar diferentes estudios que utilizan esta teoría. Recientemente Montes *et al.* utilizó la teoría de la percolación para comparar diferentes procesos de fabricación de electrodos basados en grafito. Por ejemplo, la optimización de la cantidad de material conductor en biocompuestos basados en grafito/epoxi, con el objetivo de mejorar las propiedades electroquímicas y la respuesta electroanalítica de estos materiales, para ser usados en el desarrollo de (bio)sensores.

Existen diferentes estudios que muestran la necesidad de evaluar el umbral de percolación en materiales nanocompuestos basados en sistemas poliméricos reforzados con rGO. Estos estudios concluyen que las propiedades eléctricas de estos materiales dependen de diferentes factores, como son la forma y el tamaño de las partículas conductoras, la carga de material conductor, el método de preparación; así como, la dispersión del material en la matriz polimérica. Olivé-Monllau *et al.* desarrolló una curva de percolación utilizando nanotubos de carbono como material conductor y una resina epoxi como matriz aislante, para la construcción de electrodos compuestos con fines amperométricos. En esta curva se podían distinguir diferentes zonas dependiendo de la carga de nanotubos de carbono que presentaba el compuesto. Como se puede ver en la Figura 1.5, la primera zona es la zona de alta resistencia eléctrica, (*high resistance zone composite zone*, HRC) donde la conductividad es mínima. La segunda zona se denomina zona de percolación (PC), donde el material empieza a ser conductor y la resistencia empieza a disminuir rápidamente. La zona cercana a la percolación (NPC) o segunda percolación es donde el nanocompuesto alcanza prácticamente la máxima conductividad, y la zona baja de resistencia (LRC) a

partir del cual la conductividad es máxima y prácticamente no se ve influenciada por la carga de material conductor en el interior del compuesto.



**Figura 1.5** Curva de percolación donde se muestra la dependencia de la resistencia de un nanocompuesto basado en nanotubos de carbono y resina epoxi, respecto a la carga de material conductor: HRC (a), PC (b), NPC (c), y LRC (d).

Generalmente, el criterio usado para la optimización de nanocompuestos basados en materiales poliméricos conductores ha tenido en cuenta, fundamentalmente, las propiedades eléctricas obtenidas de la curva de percolación. Debido a la alta dependencia de la conductividad eléctrica del nanocompuesto respecto a la cantidad de material conductor en la matriz aislante, es necesario una previa caracterización de estos materiales con el fin de escoger la mejor composición que proporcione las mejores propiedades electroquímicas para poder, posteriormente, desarrollar transductores electroquímicos y (bio)sensores más eficientes, con mejores límites de detección, mayor sensibilidad, y estabilidad, y reproducibilidad en la respuesta analítica.

## 1.8 Caracterización de los electrodos nanocompuestos basados en óxido de grafeno reducido

Uno de los factores que debe tenerse en cuenta en la construcción de electrodos basados en materiales carbonáceos (rGO, grafito, nanotubos de carbono, etc.), es la dependencia directa entre la respuesta electroquímica y la relación de composiciones entre el material conductor y el polímero o matriz de refuerzo. Teniendo en cuenta este aspecto, la composición final del material debe tener un valor de resistividad lo suficientemente baja para que permita el paso de la corriente eléctrica a través del electrodo. Al mismo tiempo, esta composición es la que generará el área electroactiva en la superficie del electrodo. Tanto el material conductor en el seno del nanocompuesto como el expuesto en la superficie del electrodo, son factores que influirán notablemente en la respuesta analítica del dispositivo final. Un nanocompuesto formado con altas cargas de material conductor, hará que las zonas conductoras en la superficie del electrodo estén muy próximas entre sí. Por el contrario, si se reduce la cantidad de material conductor en relación con el polímero, las zonas conductoras estarán más separadas. Como se ha mencionado en la § 1.3, la optimización de los sensores basados en haces de microelectrodos depende, principalmente, de la geometría y dimensiones de los microelectrodos que conforman el haz y de la separación entre ellos. Debido a que la distribución de las cargas en el nanocompuesto es aleatoria es necesario una caracterización morfológica, eléctrica y electroquímica de la superficie que permita determinar la composición óptima del material nanocompuesto y, consecuentemente, una separación óptima de las partículas conductoras en la superficie del electrodo con el fin de desarrollar biosensores amperométricos más eficaces.

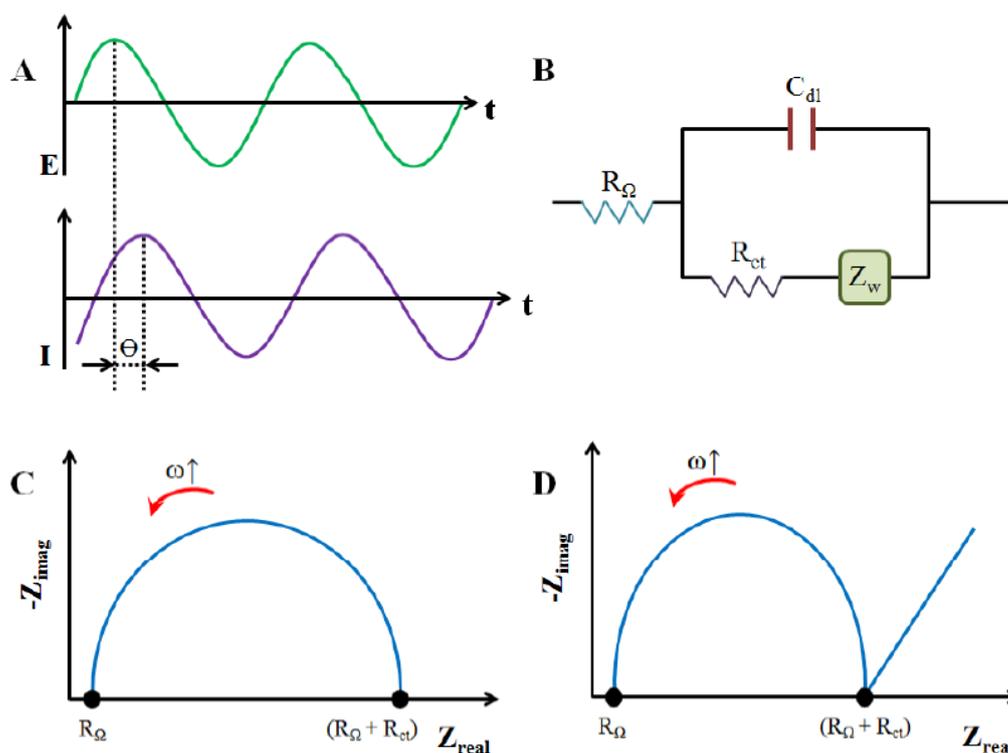
### 1.8.1 Caracterización electroquímica: Espectroscopia electroquímica de impedancia y voltamperometría cíclica

Durante el transcurso de esta Tesis doctoral, se han utilizado diferentes técnicas electroquímicas que han permitido evaluar y caracterizar la respuesta electroquímica de los sensores nanocompuestos basados en rGO. Parámetros como el diámetro del electrodo, la composición y la homogenización del material compuesto, influirán drásticamente en la reproducibilidad y la sensibilidad del sensor. La voltamperometría

cíclica (*Cyclic Voltammetry*, CV) y la espectroscopía electroquímica de impedancia (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS) han contribuido satisfactoriamente a determinar los parámetros electroquímicos que han permitido desarrollar sensores con mayor sensibilidad, intervalo lineal de respuesta y límites de detección más bajos.

### 1.8.1.1 Espectroscopia electroquímica de impedancia

El concepto impedancia fue introducido por primera vez en 1886 por el ingeniero eléctrico, matemático y físico Oliver Heaviside, quien adaptó números complejos al estudio de circuitos eléctricos.<sup>93</sup> Esta técnica permite estudiar las cinéticas de los procesos electroquímicos que tienen lugar en la superficie de los electrodos, fenómenos de las dobles capas, etc., por lo que resulta una técnica de caracterización muy útil en campos de la electroquímica y la (bio)electroquímica.<sup>94</sup> La EIS es una técnica de caracterización que permite obtener información eléctrica en un intervalo de frecuencias.



**Figura 1.6** Esquema de funcionamiento de una medida EIS. Excitación sinusoidal aplicada a un sistema de corriente sinusoidal desplazado en fase (A). Circuito equivalente para un diagrama de impedancia (circuito de Randles) (B). Proceso bajo control cinético (C). Proceso mixto controlado por cinética y difusión (D).

Con esta técnica se puede estudiar el proceso electroquímico que tiene lugar en la celda de trabajo ajustando la respuesta de corriente eléctrica obtenida, a un circuito eléctrico resultante de combinar resistores y capacitores. Este es el principio de los circuitos equivalentes, a partir de los cuales se extraerán los parámetros eléctricos que permitirán predecir el comportamiento electroquímico de los electrodos. La técnica EIS consiste en aplicar un potencial de corriente alterna  $E(t)$ , de tipo sinusoidal y de frecuencia variable (Figura 1.6 (A)), sobre el material estudiado, midiendo la impedancia del circuito o resistencia al paso de la corriente. Un potencial de corriente alterna de tipo sinusoidal se puede expresar según la ecuación 1.10:

$$E(t) = E^0 \sin(\omega t) \quad \text{Ecuación 1.10}$$

Donde,  $E^0$  es la amplitud máxima de potencial y  $\omega$  es la frecuencia angular (rad/s) que se expresa como  $2\pi$  por la frecuencia (Hz). La respuesta de corriente obtenida (Ecuación 1.11) también es de tipo sinusoidal, con la misma frecuencia, pero desplazada en fase como se puede observar en la Figura 1.6.

$$I(t) = I^0 \sin(\omega t - \emptyset) \quad \text{Ecuación 1.11}$$

Donde,  $I^0$  es la amplitud de corriente y  $\emptyset$  es el desplazamiento en fase de la intensidad respecto al potencial. Este desplazamiento representa la capacidad relativa, resistividad, y el carácter inductivo del sistema electroquímico. En general, se puede definir la impedancia como la habilidad de un circuito a resistir el flujo de corriente. La impedancia es similar a la resistencia (es la relación entre el voltaje y la corriente), pero también mide la habilidad de un circuito a conservar la energía. Se puede expresar la impedancia como el cociente del voltaje entre la intensidad de corriente según la ecuación 1.12

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} \quad \text{Ecuación 1.12}$$

Utilizando la fórmula de Euler ( $e^{j\varphi} = \cos\varphi + j\sin\varphi$ ) se puede expresar la impedancia como una función compleja (Ecuación 1.13):

$$Z = Z^0(\cos\emptyset + j\sin\emptyset) = Z_{real} + jZ_{imag} \quad \text{Ecuación 1.13}$$

Donde,  $Z_{real}$  es la parte real,  $j = \sqrt{-1}$  y  $Z_{imag}$  es la parte imaginaria de la impedancia.

Existen diferentes formas de representar la impedancia, pero el más utilizado en electroquímica cuando se estudia la cinética de la transferencia electrónica son los diagramas de Nyquist, ya que permiten una fácil predicción de los circuitos eléctricos. Estos diagramas consisten en representar la parte imaginaria ( $Z_{\text{imag}}$ ) en función de la parte real ( $Z_{\text{real}}$ ), mostrando frecuentemente un semicírculo (Figura 1.6 (C y D)). Este hecho implica que, en este tipo de gráficos no se especifica la frecuencia a la que se ha realizado el experimento. La información que se puede extraer se lleva a cabo mediante el ajuste de los datos de impedancia obtenidos a un circuito eléctrico equivalente que reproduce el espectro de impedancia durante el experimento. Esto permite reproducir el comportamiento de procesos reales, como la difusión del electrolito entre el electrodo de referencia y el de trabajo, la carga de doble capa electroquímica o la transferencia de carga que tiene lugar durante un proceso faradaico.

Un circuito simplificado puede estar formado por un condensador ( $C_{\text{dl}}$ ), el cual corresponde a la carga de la doble capa eléctrica, conectado en paralelo a una resistencia que corresponde a la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{\text{CT}}$ ) y en serie con otra resistencia o resistencia óhmica ( $R_{\Omega}$ ), correspondiente a la resistencia del electrolito al paso de la corriente y material del electrodo (Figura 1.6 (B)). Cuando el diagrama de Nyquist está dominado por un semicírculo, se puede concluir que el sistema electroquímico está limitado por la transferencia electrónica y corresponde a un proceso electroquímico controlado cinéticamente (Figura 1.6 (C)), es decir, la velocidad de la transferencia de carga en la superficie del electrodo es el factor limitante. En determinados procesos, estos diagramas presentan una zona lineal que indica que la transferencia electrónica es alta y la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo es el factor limitante (Figura 1.6 (D)). Para reproducir estos efectos, se introduce un nuevo componente al circuito de ajuste llamado Warburg (W).<sup>95,96</sup> Este elemento depende de la concentración y del coeficiente del par redox utilizado, del área electroactiva del electrodo y del número de electrones involucrados en el proceso electroquímico.<sup>97</sup>

### 1.8.1.2 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (*Cyclic Voltammetry*, CV) es una técnica ampliamente usada en el campo de la electroquímica ya que permite obtener mucha información analítica útil

de una manera sencilla. Esta técnica permite el estudio básico de procesos redox, estudio de mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas o el estudio de especies intermedias de una reacción, desde un punto de vista de análisis cuantitativo.<sup>19</sup>

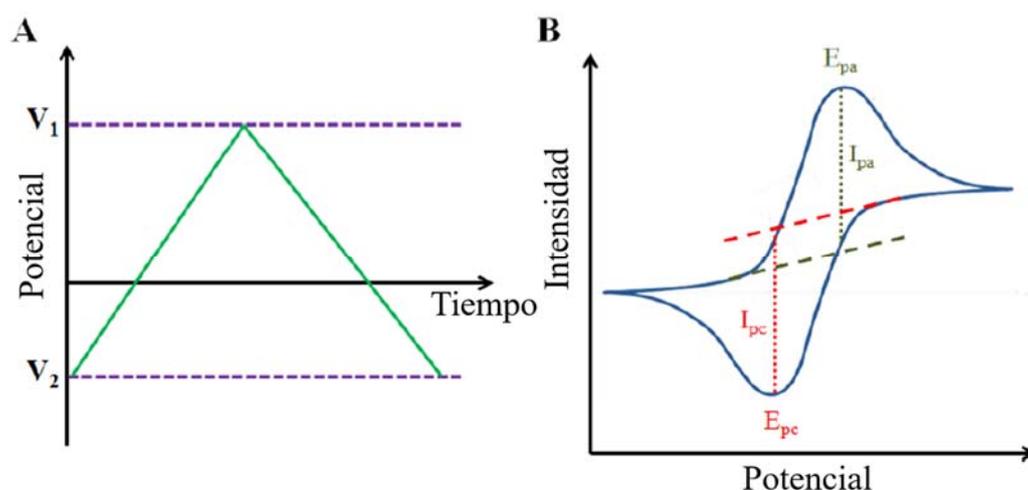
La CV es una técnica que mide la intensidad de corriente cuando se aplica un barrido de potencial de forma cíclica aplicando una velocidad constante, entre unos potenciales de trabajo previamente fijados, tanto en sentido anódico (valores positivos de potencial) como en sentido catódico (valores negativos de potencial). De este modo cuando el potencial varía en sentido anódico el electrodo refleja intensidades de corriente anódicas y cuando varía en sentido catódico se reflejan las intensidades debido a procesos de reducción. Cuando la intensidad de corriente anódica aumenta, la oxidación de la especie electroactiva esta favorecida, hasta llegar a un valor máximo el cual corresponde a las condiciones de máxima polarización del electrodo y se genera un pico característico de oxidación. Debido a que las medidas se realizan en condiciones mínimas de convección (solución no agitada), al invertir la dirección de barrido, la especie electroactiva oxidada que se encuentra en la superficie del electrodo se reduce generando una intensidad de corriente catódica hasta llegar a su máximo, formando de esta manera un pico característico de reducción. Estos experimentos se realizan utilizando tres electrodos: trabajo, auxiliar y referencia. La corriente circula a través del electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, y el potencial aplicado en el electrodo de trabajo es medido respecto un electrodo de referencia.

Los parámetros más importantes que se pueden extraer de un voltamperograma cíclico son las intensidades de corriente de pico anódico ( $I_p^a$ ) y catódico ( $I_p^c$ ), así como el valor de los potenciales correspondientes a estos puntos (potencial de pico anódico,  $E_p^a$  y potencial de pico catódico  $E_p^c$ ). Estos parámetros se definen tal y como se muestra en la Figura 1.7. Para una reacción electroquímica reversible podemos concluir que:

- i. La separación entre los picos de potencial es  $0,059/n$ , donde  $n$  es el número de electrones que participan en la reacción electroquímica ( $\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n$ ).
- ii. Los valores de intensidad de pico catódico y anódico coinciden en valor absoluto ( $|I_{pa}| = |I_{pc}|$ ).
- iii. Los potenciales de pico son independientes de la velocidad de barrido a la que se ha hecho la medida ( $v$ ).

- iv. Las intensidades de pico son proporcionales a  $v^{1/2}$ .

Con el objetivo de poder estudiar el comportamiento electroquímico de los electrodos desarrollados, generalmente se utilizan pares redox reversibles como por ejemplo, soluciones de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  o  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ . Los procesos cinéticos electroquímicos asociados a la oxidación/reducción de las especies presentes en solución, dependen de las características de la superficie del electrodo y el material que la compone.



**Figura 1.7** Representación esquemática de la onda de CV (A). Esquema de un voltamperograma cíclico típico para un sistema redox reversible ideal (B).

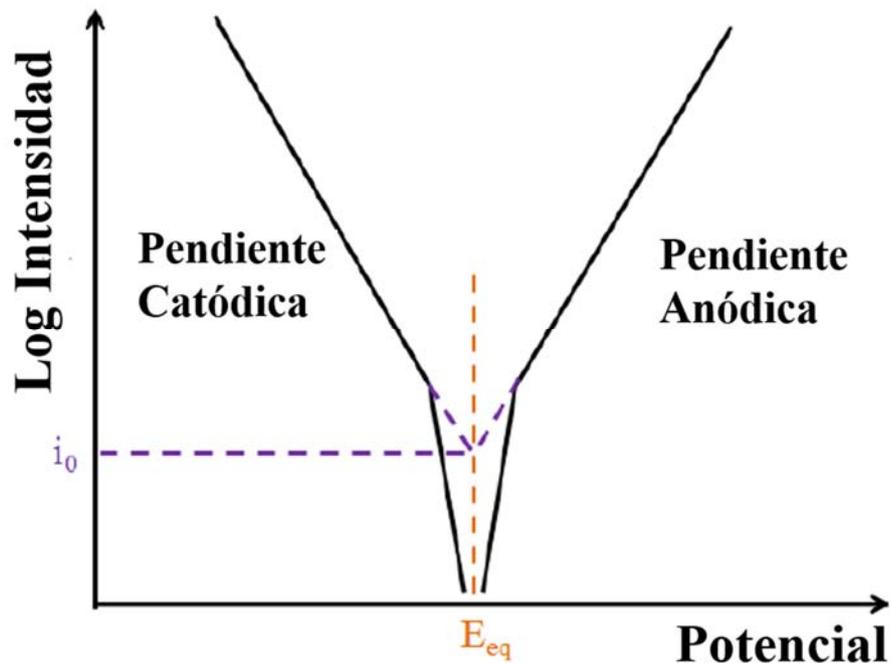
Otro parámetro de gran importancia que se puede obtener de la CV es el área electroactiva del electrodo. Este parámetro se extrae de la ecuación modificada de Randles–Sevčik, donde se relaciona la intensidad de pico, la concentración de la especie electroactiva que reacciona en el sistema electroquímico y la velocidad de barrido:<sup>98</sup>

$$I_p = 3,01 \times 10^5 \cdot n^{3/2} (\alpha D_a v)^{1/2} A \cdot C_a \quad \text{Ecuación 1.14}$$

Donde,  $n$  es el número de electrones que participan en la reacción redox,  $\alpha$  corresponde al coeficiente de transferencia,  $D_a$  es el coeficiente de difusión,  $v$  es la velocidad de barrido a la que se realiza el experimento,  $A$  es el área electroactiva del electrodo y  $C_a$  es la concentración molar de la especie redox. En un sistema reversible, donde la reacción está controlada por difusión se esperaría un comportamiento lineal al representar  $I_p$  en función de  $v^{1/2}$ .

Por otro lado, si se representa el  $\log(I)$  vs. el potencial aplicado se obtiene el diagrama de Tafel (Figura 1.8). Para poder representar este diagrama es necesario que el proceso electroquímico no esté controlado por la transferencia de carga. Este diagrama permite extraer información sobre la intensidad de intercambio ( $i_0$ ) la cual está relacionada con la reversibilidad del proceso. El diagrama de Tafel también aporta información sobre la resistencia de carga ( $R_{CT}$ ) del proceso mediante la ecuación 1.15.

$$i_0 = RT/nFR_{CT} \quad \text{Ecuación 1.15}$$



**Figura 1.8** Diagrama de Tafel para un sistema electroquímico reversible, donde  $i_0$  corresponde al intercambio de corriente y  $E_{eq}$  al potencial de equilibrio.

### 1.8.1.3 Amperometría hidrodinámica

Como se ha mencionado anteriormente, un sensor electroquímico consta de un transductor el cual es capaz de medir una propiedad química y transformarla en una señal útil procesable, la cual puede ser una intensidad de corriente (amperometría), un voltaje (potenciometría) o cambios en la impedancia (conductimetría). De entre estas técnicas, la amperometría presenta unas ventajas respecto a las otras técnicas electroquímicas. Fue en 1956 cuando Clark *et al.* desarrolló el primer sensor amperométrico que consistía en un

electrodo de medida de oxígeno. A diferencia de la CV esta técnica consiste en aplicar un potencial constante (potencial de polarización) en condiciones de agitación, y registrar los cambios de intensidad de corriente respecto al tiempo mediante la adición de diferentes alícuotas de una especie electroactiva. De esta manera, para cada adición de la especie electroactiva se produce un aumento de la intensidad de corriente hasta alcanzar un valor máximo donde se estabiliza. Esta intensidad según la ley de Faraday es directamente proporcional a la velocidad a la que transcurre la reacción electroquímica durante el proceso de oxidación/reducción. Esta corriente eléctrica depende directamente del transporte de masa desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo: migración, convección y difusión. Mientras la corriente de migración se puede mantener constante durante un proceso electroquímico mediante la utilización de un electrólito soporte, la corriente de convección puede ser controlada, ajustando los parámetros hidrodinámicos de la solución (agitación controlada). La corriente de difusión se debe al gradiente de concentración entre el seno de la solución y la superficie del electrodo. Esta corriente de difusión es directamente proporcional a la concentración de analito en la solución en condiciones de máximo gradiente de concentración, situación que sucede cuando se aplica un potencial sobre el electrodo de trabajo que ocasiona la máxima polarización. La celda electroquímica consta de un electrodo de trabajo, donde ocurre la reacción electroquímica, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, sumergidos en una fase electrolítica. Generalmente el proceso de detección consta de 3 etapas:

- i. Difusión del analito hasta la superficie del electrodo de trabajo.
- ii. Reacción de transferencia electrónica en la superficie del electrodo.
- iii. Difusión del producto de la reacción desde la superficie del electrodo hasta el seno de la solución.

Durante el transcurso de la reacción electródica, el electrodo de trabajo puede actuar como ánodo o cátodo, dependiendo de la especie electroactiva que se está analizando, y del potencial que se esté aplicando. La intensidad de corriente producida está relacionada con la concentración de analito por la ley de Faraday, así como el transporte de masa según la ecuación 1.16.

$$I = nF \frac{\partial C}{\partial t} \quad \text{Ecuación 1.16}$$

Debido la naturaleza heterogénea del proceso, la velocidad de reacción depende de la velocidad de la transferencia electrónica en la superficie del electrodo y del transporte de masa ( $\partial C/\partial t$ ). En condiciones de velocidad máxima de reacción (máximo gradiente de concentración), el proceso está limitado por la velocidad de transporte de masa hacia la superficie del electrodo, lo cual ocurre cuando la concentración de analito en la superficie es cero, o lo que es lo mismo, cuando se aplica el potencial de máxima polarización del electrodo. Este potencial, puede ser más o menos extremo, lo cual influirá en la selectividad analítica del proceso. Generalmente, los sensores amperométricos ofrecen una buena sensibilidad analítica con un límite de respuesta lineal de unas tres o cuatro órdenes de concentración. Los sensores amperométricos basados en nanomateriales de carbono pueden tener un coste económico bajo y pueden llegar a construirse en masa mediante tecnología de miniaturización. Este hecho favorece que estos sensores puedan ser integrados como detectores en sistemas de análisis de inyección en flujo (*Flow Injection Analysis*, FIA) o en sistemas miniaturizados aportando todas las ventajas que poseen estas técnicas automatizadas.

## 1.9 Biosensores amperométricos basados en nanocompuestos de óxido de grafeno reducido

Un biosensor es un sensor químico que integra un receptor de origen biológico que está en contacto directo con el transductor.<sup>3</sup> Este componente biológico aporta una mayor selectividad analítica frente a un determinado analito respecto de otros sensores debido a la alta especificidad que poseen estas sustancias biológicas a la hora de reaccionar con diferentes analitos. Estos biosensores pueden clasificarse de dos maneras distintas, dependiendo del método de transducción o en función de la naturaleza del proceso biológico que da lugar a la señal primaria generada. Podemos distinguir dos grandes grupos:

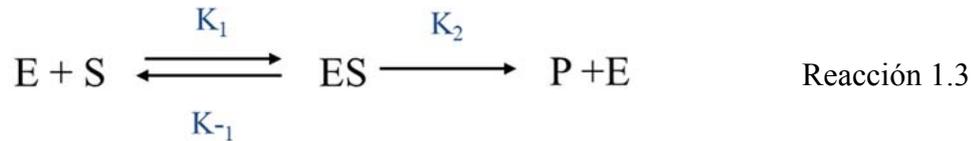
- **Biosensores catalíticos:** Están formados por receptores que pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos. Los biosensores enzimáticos son los más utilizados.
- **Biosensores de afinidad:** Biosensores basados en inmunosensores, quimiorreceptores y ácidos nucleicos.

Un biosensor basado en un material (bio)compósito proviene de la combinación de tres o más materiales de diferente naturaleza, donde al menos uno de ellos es de origen biológico.<sup>99</sup> Los materiales compuestos basados en una dispersión de materiales conductores como por ejemplo, el rGO en una matriz aislante polimérica son unos excelentes candidatos para integrar estas sustancias biológicas en el seno del transductor.<sup>100</sup> La integración de estas sustancias en la matriz de estos nanocompuestos, aporta nuevas características muy ventajosas respecto a los biosensores con inmovilización en la superficie como puede ser la regeneración de la superficie sensora con un simple pulido de esta, regenerando de nuevo el biosensor. Con la incorporación de estos componentes biológicos en el desarrollo de biosensores amperométricos, la separación espacial y la distribución de las partículas conductoras se puede ver afectada, por lo que es necesario una exhaustiva optimización y caracterización del nuevo biocompósito previa a su aplicación analítica, para obtener un biosensor con las mejores características de respuesta.

### 1.9.1 Biosensores enzimáticos

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores en todo tipo de procesos biológicos aumentando la velocidad de reacción hacia el equilibrio termodinámico sin que este se consuma durante la reacción. Estos tienen una alta especificidad que permite transformar los sustratos en sus respectivos productos de reacción.<sup>101,102</sup>

Cuando se utiliza este tipo de sustancias en la construcción de sensores con finalidades analíticas, es muy importante tener en cuenta la sensibilidad del sistema. Esta vendrá relacionada por la afinidad que tenga el enzima con el correspondiente sustrato y la velocidad a la que el complejo enzima-sustrato evolucionan para dar el producto. Mediante la ecuación de Michaelis Menten se puede cuantificar estos factores. En la reacción 1.3 se muestra, de forma esquemática, el proceso de interacción entre enzima y sustrato para dar lugar al producto de la reacción y liberación de la enzima:



Donde,  $E$  es la enzima,  $S$  el sustrato,  $ES$  el complejo enzima-sustrato,  $P$  el producto de la reacción,  $k_1$  y  $k_{-1}$ , las constantes cinéticas de formación del complejo enzima-sustrato y su inversa respectivamente y  $k_2$  la constante cinética de formación del producto. Mediante la teoría del estado estacionario obtenemos la expresión de la ecuación 1.17 que relaciona la velocidad de formación del producto con la concentración inicial de sustrato y la concentración de enzima en la disolución:

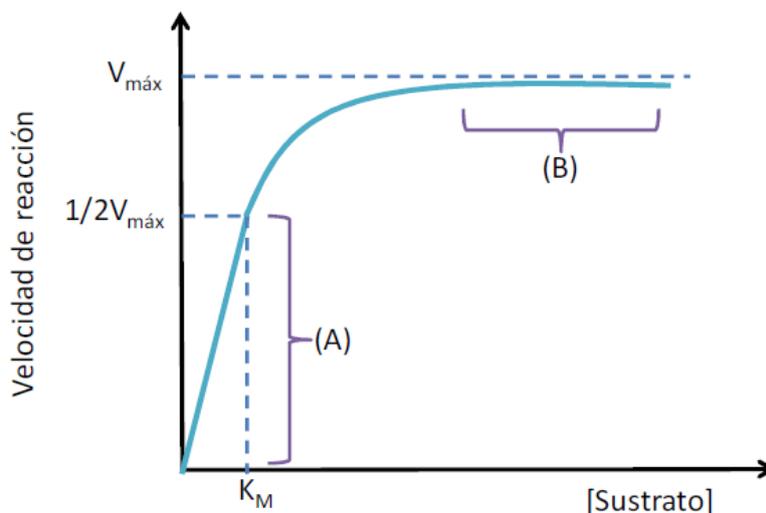
$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación 1.17}$$

Donde  $K_M$  es la constante de Michaels Menten, que viene dada por la ecuación 1.18:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad \text{Ecuación 1.18}$$

La constante  $K_M$  se puede determinar experimentalmente como la concentración de sustrato a la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima y es una forma de obtener información de la afinidad de la enzima por el sustrato.

La velocidad de la reacción enzimática en un biosensor sigue el comportamiento cinético de la ecuación 1.16. Para una determinada concentración constante de enzima la velocidad de reacción biocatalítica presenta una respuesta como la que se puede observar en la Figura 1.9. Asumiendo, por ejemplo, que, en un biosensor amperométrico, la señal medida es fruto de la oxidación o reducción del producto de la reacción biocatalítica, esta señal es proporcional a la velocidad de reacción catalítica, dado que cuanto mayor es la concentración de sustrato, mayor será la velocidad con la que se generen los productos, y en el caso que estos productos sean electroquímicamente activos, mayor será la señal generada en la superficie del electrodo.



**Figura 1.9** Respuesta enzimática, basada en la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato. Región donde se cumple  $[S] \ll K_M$  y es útil desde el punto de vista de aplicación en biosensores amperométricos (A). Región que nos permite la determinación cuantitativa de la actividad enzimática (B).

### 1.9.1.1 Biosensor de glucosa oxidasa

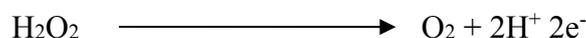
En 1953 Clark y Lyons desarrollaron el primer sensor enzimático de glucosa. Este utilizaba el enzima glucosa oxidasa (GOD) siguiendo la siguiente reacción:



El (bio)sensor se basa en un electrodo de oxígeno con una membrana permeable a gases y sobre esta se deposita una solución tamponada que contiene el enzima GOD. Esta solución permanece sobre el electrodo gracias a la ayuda de una membrana de diálisis. Cuando el sensor es introducido en una muestra, la glucosa y el oxígeno molecular atraviesan la membrana permeable selectiva y reaccionan con el enzima, y solamente el oxígeno no consumido atravesará la membrana permeable a gases y será detectado por el electrodo. Por lo que la señal catódica será indirectamente proporcional a la concentración de glucosa en nuestra solución. El inconveniente principal de este biosensor es que la respuesta está limitada por la concentración de oxígeno, además que presenta una baja sensibilidad y un tiempo de respuesta bastante alto. Por otro lado, este biosensor presenta muy pocas interferencias.

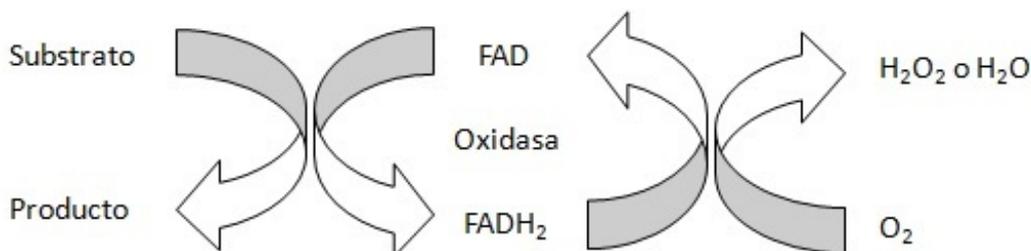
Un biosensor de glucosa también puede operar en sentido anódico inmovilizando, por ejemplo, el enzima GOD sobre un transductor de carbono y aplicando el potencial

adecuado para detectar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  procedente de la reacción biocatalítica. En este caso la señal analítica será directamente proporcional a la concentración de glucosa en el seno de la disolución. Esta detección presenta algunos problemas analíticos como puede ser la dependencia de la reacción electrodiica con el pH.



En este sentido el potencial a aplicar es relativamente alto (0,6 V y 0,7 V vs. Ag/AgCl, a pH 7,0) por lo que cuando se trabaja con muestras biológicas será necesario un pretratamiento previo de la muestra.

Este tipo de enzimas son capaces de catalizar la transferencia de hidrógeno desde el sustrato hacia el oxígeno molecular. Estas enzimas contienen un grupo prostético fuertemente enlazado a la apoenzima, derivados de la flavina y constituidos por el mononucleótido de flavina (FMN) o por el dinucleótido de flavina/adenina (FAD), estos grupos son los que le otorgan las propiedades redox a estas enzimas. Este tipo de enzimas pueden transferir dos o cuatro electrones al oxígeno molecular (Figura 1.10).



**Figura 1.10** Esquema del mecanismo de acción de una enzima oxidasa.

El grupo prostético FAD oxida al sustrato y, su forma reducida FADH<sub>2</sub>, es reoxidada a su forma nativa por el oxígeno presente en el medio, que hace el papel de aceptor natural de electrones, transformándose en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O. Por consiguiente, estos sistemas son dependientes del oxígeno, el cual es un *co*sustrato esencial en los sistemas biológicos donde actúan estas enzimas.

## 1.10 Bibliografía

- (1) Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis* **2006**, *18* (4), 319–326. <https://doi.org/10.1002/elan.200503415>.
- (2) Montes, R.; Bartrolí, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Towards to the Improvement of the Analytical Response in Voltammetric Sensors Based on Rigid Composites. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *733*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.09.022>.
- (3) Zhu, Z.; Garcia-Gancedo, L.; Flewitt, A. J.; Xie, H.; Moussy, F.; Milne, W. I. A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene. *Sensors (Switzerland)* **2012**, *12* (5), 5996–6022. <https://doi.org/10.3390/s120505996>.
- (4) Wang, J.; Naser, N.; Angnes, L.; Wu, H.; Chen, L. Metal-Dispersed Carbon Paste Electrodes. *Anal. Chem.* **1992**, *64* (11), 1285–1288. <https://doi.org/10.1021/ac00035a016>.
- (5) Stankovich, S.; Dikin, D. A.; Dommett, G. H. B.; Kohlhaas, K. M.; Zimney, E. J.; Stach, E. A.; Piner, R. D.; Nguyen, S. B. T.; Ruoff, R. S. Graphene-Based Composite Materials. *Nature* **2006**, *442* (7100), 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature04969>.
- (6) Rubianes, M. D.; Rivas, G. A. Carbon Nanotubes Paste Electrode. *Electrochemistry Communications*. **2003**, pp 689–694. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(03\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(03)00168-1).
- (7) Kim, H.; Abdala, A. A.; MacOsco, C. W. Graphene/Polymer Nanocomposites. *Macromolecules* **2010**, *43* (16), 6515–6530. <https://doi.org/10.1021/ma100572e>.
- (8) Dhand, V.; Rhee, K. Y.; Ju Kim, H.; Ho Jung, D. A Comprehensive Review of Graphene Nanocomposites: Research Status and Trends. *J. Nanomater.* **2013**, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/763953>.
- (9) Manzanares Palenzuela, C. L.; Pumera, M. (Bio)Analytical Chemistry Enabled by 3D Printing: Sensors and Biosensors. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2018**, *103*, 110–

118. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.016>.
- (10) Young, R. J.; Kinloch, I. A.; Gong, L.; Novoselov, K. S. The Mechanics of Graphene Nanocomposites: A Review. *Compos. Sci. Technol.* **2012**, *72* (12), 1459–1476. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.05.005>.
- (11) Wang, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2005**, *17* (1), 7–14. <https://doi.org/10.1002/elan.200403113>.
- (12) Pumera, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. Carbon Nanotube-Epoxy Composites for Electrochemical Sensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **2006**, *113* (2), 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.010>.
- (13) Montes, R.; Céspedes, F.; Baeza, M. Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor for IgG Detection Based on Optimized Rigid Biocomposites. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.081>.
- (14) Montes, R.; Baeza, M.; Muñoz, J. 0D Polymer Nanocomposite Carbon-Paste Electrodes Using Carbon Nanohorns: Percolating Networks, Electrochemical Achievements and Filler Comparison. *Compos. Sci. Technol.* **2020**, *197* (May), 0–4. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2020.108260>.
- (15) Muñoz, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Modified Multiwalled Carbon Nanotube/Epoxy Amperometric Nanocomposite Sensors with CuO Nanoparticles for Electrocatalytic Detection of Free Chlorine. *Microchem. J.* **2015**, *122*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.001>.
- (16) K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. G. and A. A. F. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **2016**, *306* (5696), 666–669.
- (17) Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S.; Worsfold, P. J. *Biosensors: Fundamentals and Applications*; 1987; Vol. 201. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)85361-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)85361-1).
- (18) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63* (9), 1247–1250.

- <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- (19) Wang, J. *Analytical Electrochemistry, Third Edition*; 2006. <https://doi.org/10.1002/0471790303>.
- (20) Doctoral, T. Raquel Montes Martínez. Caracterización de (bio)compósitos en función de la proporción de grafito y optimización de la composición para su aplicación en el desarrollo de (bio)sensores amperométricos. **2014**.
- (21) Mássen, M.; Liu, Z.; Haruyama, T.; Kobatake, E.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. Immunosensing with Amperometric Detection, Using Galactosidase as Label and P-Aminophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside as Substrate. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304* (3), 353–359. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00645-3](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00645-3).
- (22) Alvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U. Mass Production of Biosensors. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (11), 525–533. <https://doi.org/10.1021/ac00059a001>.
- (23) Chatti, M.; Gardiner, J. L.; Fournier, M.; Johannessen, B.; Williams, T.; Gengenbach, T. R.; Pai, N.; Nguyen, C.; MacFarlane, D. R.; Hocking, R. K.; Simonov, A. N. *Intrinsically Stable in Situ Generated Electrocatalyst for Long-Term Oxidation of Acidic Water at up to 80 °C*; 2019; Vol. 2. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0277-8>.
- (24) Muñoz, J.; González-Campo, A.; Riba-Moliner, M.; Baeza, M.; Mas-Torrent, M. Chiral Magnetic-Nanobiofluids for Rapid Electrochemical Screening of Enantiomers at a Magneto Nanocomposite Graphene-Paste Electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *105*, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.024>.
- (25) Atif, R.; Shyha, I.; Inam, F. Mechanical, Thermal, and Electrical Properties of Graphene-Epoxy Nanocomposites-A Review. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (8). <https://doi.org/10.3390/polym8080281>.
- (26) Gutés, A.; Hsia, B.; Sussman, A.; Mickelson, W.; Zettl, A.; Carraro, C.; Maboudian, R. Graphene Decoration with Metal Nanoparticles: Towards Easy Integration for Sensing Applications. *Nanoscale* **2012**, *4* (2), 438–440. <https://doi.org/10.1039/c1nr11537e>.
- (27) Muñoz, J.; Montes, R.; Bastos-Arrieta, J.; Guardingo, M.; Busqué, F.; Ruíz-

- Molina, D.; Palet, C.; García-Orellana, J.; Baeza, M. Carbon Nanotube-Based Nanocomposite Sensor Tuned with a Catechol as Novel Electrochemical Recognition Platform of Uranyl Ion in Aqueous Samples. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *273* (June), 1807–1815. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.093>.
- (28) Aydoğdu, G.; Zeybek, D. K.; Pekyardimci, Ş.; Kiliç, E. A Novel Amperometric Biosensor Based on ZnO Nanoparticles-Modified Carbon Paste Electrode for Determination of Glucose in Human Serum. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2013**, *41* (5), 332–338. <https://doi.org/10.3109/21691401.2012.744994>.
- (29) Yin, P. T.; Kim, T. H.; Choi, J. W.; Lee, K. B. Prospects for Graphene-Nanoparticle-Based Hybrid Sensors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (31), 12785–12799. <https://doi.org/10.1039/c3cp51901e>.
- (30) Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2010**, *22* (10), 1027–1036. <https://doi.org/10.1002/elan.200900571>.
- (31) Banks, C. E.; Davies, T. J.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. Electrocatalysis at Graphite and Carbon Nanotube Modified Electrodes: Edge-Plane Sites and Tube Ends Are the Reactive Sites. *Chem. Commun.* **2005**, No. 7, 829–841. <https://doi.org/10.1039/b413177k>.
- (32) Davies, T. J.; Compton, R. G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular and Random Arrays of Microdisc Electrodes: Theory. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.07.022>.
- (33) Caudill, W. L.; Howell, J. O.; Wightman, R. M. Flow Rate Independent Amperometric Cell. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (14), 2532–2535. <https://doi.org/10.1021/ac00251a028>.
- (34) Welch, C. M.; Banks, C. E.; Simm, A. O.; Compton, R. G. Silver Nanoparticle Assemblies Supported on Glassy-Carbon Electrodes for the Electro-Analytical Detection of Hydrogen Peroxide. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3205-5>.
- (35) Welch, C. M.; Compton, R. G. The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: A

- Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384* (3), 601–619. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0230-3>.
- (36) Castro Neto, A. H.; Guinea, F.; Peres, N. M. R.; Novoselov, K. S.; Geim, A. K. The Electronic Properties of Graphene. *Rev. Mod. Phys.* **2009**, *81* (1), 109–162. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.81.109>.
- (37) Windmiller, J. R.; Wang, J. Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **2013**, *25* (1), 29–46. <https://doi.org/10.1002/elan.201200349>.
- (38) Chee, W. K.; Lim, H. N.; Zainal, Z.; Huang, N. M.; Harrison, I.; Andou, Y. Flexible Graphene-Based Supercapacitors: A Review. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (8), 4153–4172. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b10187>.
- (39) Cardoso, R. M.; Kalinke, C.; Rocha, R. G.; dos Santos, P. L.; Rocha, D. P.; Oliveira, P. R.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Additive-Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensors: A Critical Review. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1118*, 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>.
- (40) Benka, S. G. Two-Dimensional Atomic Crystals. *Phys. Today* **2005**, *58* (9), 9–9. <https://doi.org/10.1063/1.4797258>.
- (41) Gómez-Navarro, C.; Weitz, R. T.; Bittner, A. M.; Scolari, M.; Mews, A.; Burghard, M.; Kern, K. Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. *Nano Lett.* **2007**, *7* (11), 3499–3503. <https://doi.org/10.1021/nl072090c>.
- (42) Tan, R. K. L.; Reeves, S. P.; Hashemi, N.; Thomas, D. G.; Kavak, E.; Montazami, R.; Hashemi, N. N. Graphene as a Flexible Electrode: Review of Fabrication Approaches. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5* (34), 17777–17803. <https://doi.org/10.1039/c7ta05759h>.
- (43) Robinson, J. T.; Perkins, F. K.; Snow, E. S.; Wei, Z.; Sheehan, P. E. Reduced Graphene Oxide Molecular Sensors. *Nano Lett.* **2008**, *8* (10), 3137–3140. <https://doi.org/10.1021/nl8013007>.
- (44) Martín, A.; Escarpa, A. Graphene: The Cutting-Edge Interaction between

- Chemistry and Electrochemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *56*, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.008>.
- (45) Rajaji, U.; Arumugam, R.; Chen, S. M.; Chen, T. W.; Tseng, T. W.; Chinnapaiyan, S.; Lee, S. Y.; Chang, W. H. Graphene Nanoribbons in Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13* (7), 6643–6654. <https://doi.org/10.20964/2018.07.51>.
- (46) Liu, Y.; Dong, X.; Chen, P. Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2283–2307. <https://doi.org/10.1039/c1cs15270j>.
- (47) Rao, C. N. R.; Sood, A. K.; Voggu, R.; Subrahmanyam, K. S. Some Novel Attributes of Graphene. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1* (2), 572–580. <https://doi.org/10.1021/jz9004174>.
- (48) Geim, A. K. Graphene : Status and Prospects. **2009**, *324* (June), 1530–1535.
- (49) Samorì, P.; Palermo, V.; Feng, X. Chemical Approaches to 2D Materials. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (29), 6027–6029. <https://doi.org/10.1002/adma.201601834>.
- (50) Zhu, Y.; Murali, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J. W.; Potts, J. R.; Ruoff, R. S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (35), 3906–3924. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>.
- (51) Gogotsi, Y. Controlling Graphene Properties Through Chemistry. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (19), 2509–2510. <https://doi.org/10.1021/jz201145a>.
- (52) Jankovský, O.; Marvan, P.; Nováček, M.; Luxa, J.; Mazánek, V.; Klímová, K.; Sedmidubský, D.; Sofer, Z. Synthesis Procedure and Type of Graphite Oxide Strongly Influence Resulting Graphene Properties. *Appl. Mater. Today* **2016**, *4*, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2016.06.001>.
- (53) De Silva, K. K. H.; Huang, H. H.; Joshi, R. K.; Yoshimura, M. Chemical Reduction of Graphene Oxide Using Green Reductants. *Carbon N. Y.* **2017**, *119*, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.04.025>.
- (54) Park, S.; Ruoff, R. S. Chemical Methods for the Production of Graphenes. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (4), 217–224. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.58>.

- (55) Rao, C. N. R.; Sood, A. K.; Subrahmanyam, K. S.; Govindaraj, A. Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (42), 7752–7777. <https://doi.org/10.1002/anie.200901678>.
- (56) Suvarnaphaet, P.; Pechprasarn, S. Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors (Switzerland)* **2017**, *17* (10). <https://doi.org/10.3390/s17102161>.
- (57) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
- (58) Thirupathi, A. R.; Sidhureddy, B.; Keeler, W.; Chen, A. Facile One-Pot Synthesis of Fluorinated Graphene Oxide for Electrochemical Sensing of Heavy Metal Ions. *Electrochem. commun.* **2017**, *76*, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.01.015>.
- (59) Electrochemical Synthesis of Reduced Graphene Sheet-AuPd Alloy Nanoparticle Nanocomposites for Oxygen Reduction and Oxidase-Based Biosensors. *ECS Meeting Abstracts*. 2011. <https://doi.org/10.1149/ma2011-02/42/2505>.
- (60) Marcos Esteban, R.; Schütte, K.; Marquardt, D.; Barthel, J.; Beckert, F.; Mülhaupt, R.; Janiak, C. Synthesis of Ruthenium@graphene Nanomaterials in Propylene Carbonate as Re-Usable Catalysts for the Solvent-Free Hydrogenation of Benzene Dedicated to Prof. Ekkehard Hahn on the Occasion of His 60th Birthday. *Nano-Structures and Nano-Objects* **2015**, *2*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2015.07.002>.
- (61) Li, D.; Müller, M. B.; Gilje, S.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G. Processable Aqueous Dispersions of Graphene Nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (2), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.451>.
- (62) Hidayah, N. M. S.; Liu, W. W.; Lai, C. W.; Noriman, N. Z.; Khe, C. S.; Hashim, U.; Lee, H. C. Comparison on Graphite, Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide: Synthesis and Characterization. *AIP Conf. Proc.* **2017**, 1892. <https://doi.org/10.1063/1.5005764>.
- (63) Chung, D. D. L. Review: Graphite. *J. Mater. Sci.* **2002**, *37* (8), 1475–1489. <https://doi.org/10.1023/A:1014915307738>.

- (64) Luo, D.; Zhang, G.; Liu, J.; Sun, X. Evaluation Criteria for Reduced Graphene Oxide. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (23), 11327–11335. <https://doi.org/10.1021/jp110001y>.
- (65) Pumera, M.; Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E. L. K.; Poh, H. L. Graphene for Electrochemical Sensing and Biosensing. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (9), 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.011>.
- (66) Yang, W.; Ratinac, K. R.; Ringer, S. R.; Thordarson, P.; Gooding, J. J.; Braet, F. Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (12), 2114–2138. <https://doi.org/10.1002/anie.200903463>.
- (67) Choi, W.; Lahiri, I.; Seelaboyina, R.; Kang, Y. S. Synthesis of Graphene and Its Applications: A Review. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2010**, *35* (1), 52–71. <https://doi.org/10.1080/10408430903505036>.
- (68) Stankovich, S.; Dikin, D. A.; Piner, R. D.; Kohlhaas, K. A.; Kleinhammes, A.; Jia, Y.; Wu, Y.; Nguyen, S. B. T.; Ruoff, R. S. Synthesis of Graphene-Based Nanosheets via Chemical Reduction of Exfoliated Graphite Oxide. *Carbon N. Y.* **2007**, *45* (7), 1558–1565. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.02.034>.
- (69) Walcarius, A.; Minter, S. D.; Wang, J.; Lin, Y.; Merkoçi, A. Nanomaterials for Bio-Functionalized Electrodes: Recent Trends. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (38), 4878–4908. <https://doi.org/10.1039/c3tb20881h>.
- (70) Tang, J.; Shi, H.; Ma, G.; Luo, L.; Tang, Z. Ultrasmall Au and Ag Nanoclusters for Biomedical Applications: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8* (October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01019>.
- (71) Kinge, S.; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D. N. Self-Assembling Nanoparticles at Surfaces and Interfaces. *ChemPhysChem* **2008**, *9* (1), 20–42. <https://doi.org/10.1002/cphc.200700475>.
- (72) Nehl, C. L.; Hafner, J. H. Shape-Dependent Plasmon Resonances of Gold Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (21), 2415–2419. <https://doi.org/10.1039/b714950f>.

- (73) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes*; 2005; Vol. 36. <https://doi.org/10.1002/chin.200527215>.
- (74) Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; John Thomas, P.; Edwards, P. P. Size-Dependent Chemistry: Properties of Nanocrystals. *Chem. - A Eur. J.* **2002**, 8 (1), 28–35. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020104\)8:1<28::AID-CHEM28>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020104)8:1<28::AID-CHEM28>3.0.CO;2-B).
- (75) Lu, C.; Huang, P. J. J.; Liu, B.; Ying, Y.; Liu, J. Comparison of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide for DNA Adsorption and Sensing. *Langmuir* **2016**, 32 (41), 10776–10783. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03032>.
- (76) Al-Ansi, N.; Salah, A.; Adlat, S.; Qi, B. A Highly Sensitive Nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensor Based on 3D N-Doped Porous Graphene Aerogel Decorated with AuPd Alloy Nanoparticles. *Synth. Met.* **2020**, 264 (March), 116380. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2020.116380>.
- (77) Wang, C.; Astruc, D. Recent Developments of Metallic Nanoparticle-Graphene Nanocatalysts. *Prog. Mater. Sci.* **2018**, 94, 306–383. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.003>.
- (78) Wang, Q.; Cui, X.; Guan, W.; Zhang, X.; Liu, C.; Xue, T.; Wang, H.; Zheng, W. A Nanoflower Shaped Gold-Palladium Alloy on Graphene Oxide Nanosheets with Exceptional Activity for Electrochemical Oxidation of Ethanol. *Microchim. Acta* **2014**, 181 (3–4), 373–380. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1119-z>.
- (79) Sun, T.; Zhang, Z.; Xiao, J.; Chen, C.; Xiao, F.; Wang, S.; Liu, Y. Facile and Green Synthesis of Palladium Nanoparticles-Graphene-Carbon Nanotube Material with High Catalytic Activity. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep02527>.
- (80) Artiles, M. S.; Rout, C. S.; Fisher, T. S. Graphene-Based Hybrid Materials and Devices for Biosensing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63 (14–15), 1352–1360. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.07.005>.
- (81) Katz, E.; Willner, I. Integrated Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, 43 (45), 6042–6108. <https://doi.org/10.1002/anie.200400651>.

- (82) Putzbach, W.; Ronkainen, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors (Switzerland)* **2013**, *13* (4), 4811–4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>.
- (83) Xu, P.; Han, X.; Zhang, B.; Du, Y.; Wang, H. L. Multifunctional Polymer-Metal Nanocomposites via Direct Chemical Reduction by Conjugated Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (5), 1349–1360. <https://doi.org/10.1039/c3cs60380f>.
- (84) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Stenbock-Fermor, A.; Muñoz, M.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Tsarkova, L. A.; Baeza, M. Intermatrix Synthesis as a Rapid, Inexpensive and Reproducible Methodology for the in Situ Functionalization of Nanostructured Surfaces with Quantum Dots. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *368*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.01.277>.
- (85) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Vigués, N.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Mas, J.; Baeza, M.; Muñoz, M. Intermatrix Synthesis of Ag, AgAu and Au Nanoparticles by the Galvanic Replacement Strategy for Bactericidal and Electrocatalytically Active Nanocomposites. *New J. Chem.* **2016**, *40* (12), 10344–10352. <https://doi.org/10.1039/c6nj02468h>.
- (86) Huang, J.; Zhang, L.; Chen, B.; Ji, N.; Chen, F.; Zhang, Y.; Zhang, Z. Nanocomposites of Size-Controlled Gold Nanoparticles and Graphene Oxide: Formation and Applications in SERS and Catalysis. *Nanoscale* **2010**, *2* (12), 2733–2738. <https://doi.org/10.1039/c0nr00473a>.
- (87) Ahmadi-Moghadam, B.; Sharafimasooleh, M.; Shadlou, S.; Taheri, F. Effect of Functionalization of Graphene Nanoplatelets on the Mechanical Response of Graphene/Epoxy Composites. *Materials and Design.* 2015, pp 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2014.10.047>.
- (88) Nancy, T. E. M.; Kumary, V. A. Synergistic Electrocatalytic Effect of Graphene/Nickel Hydroxide Composite for the Simultaneous Electrochemical Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.027>.
- (89) Aradhana, R.; Mohanty, S.; Nayak, S. K. Comparison of Mechanical, Electrical and Thermal Properties in Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Filled

- Epoxy Nanocomposite Adhesives. *Polymer (Guildf)*. **2018**, *141*, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.03.005>.
- (90) Doctoral, T. Raquel Montes Martínez. **2014**.
- (91) Broadbent, S. R.; Hammersley, J. M. Percolation Processes: I. Crystals and Mazes. *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1957**, *53* (3), 629–641. <https://doi.org/10.1017/S0305004100032680>.
- (92) Scher, H.; Zallen, R. Critical Density in Percolation Processes. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53* (9), 3759–3761. <https://doi.org/10.1063/1.1674565>.
- (93) MacDonald, D. D. Reflections on the History of Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electrochim. Acta* **2006**, *51* (8–9), 1376–1388. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.02.107>.
- (94) Hara, K.; Arakawa, H.; Dssc, C.; Cell, S.; Physics, D.; Jeerage, K. M.; Noble, R. D.; Koval, C. A.; Kouhnavard, M.; Ahmad, N.; Babak, L.; Ghaffari, V.; Chandra, N.; Nath, D.; Joon, H.; Choi, W.; Lee, J. *阻抗好书-Theory, Experiment, And*; 2013; Vol. 125. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.02.003>.
- (95) Barbero, G.; Lelidis, I. Analysis of Warburg's Impedance and Its Equivalent Electric Circuits. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (36), 24934–24944. <https://doi.org/10.1039/c7cp04032f>.
- (96) Huang, J. Diffusion Impedance of Electroactive Materials, Electrolytic Solutions and Porous Electrodes: Warburg Impedance and Beyond. *Electrochim. Acta* **2018**, *281*, 170–188. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.05.136>.
- (97) Bobacka, J.; Lewenstam, A.; Ivaska, A.; Fin, A. <Electrochemical-Impedance-Spectroscopy-of-Oxidized-Poly-3-4-Ethylenedioxythiophene-Film-Electrodes-in-Aqueous-Solutions\_2000\_Journal-of-Electroanalyti.Pdf>. **2000**, *489*, 17–27.
- (98) Pacios, M.; del Valle, M.; Bartroli, J.; Esplandiu, M. J. Electrochemical Behavior of Rigid Carbon Nanotube Composite Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *619–620* (1–2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.03.019>.
- (99) Liu, L.; Deng, D.; Sun, W.; Yang, X.; Yang, S.; He, S. Electrochemical Biosensors

- with Electrocatalysts Based on Metallic Nanomaterials as Signal Labels. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13* (11), 10496–10513. <https://doi.org/10.20964/2018.11.47>.
- (100) Montes, R.; Bartrolí, J.; Baeza, M.; Céspedes, F. Improvement of the Detection Limit for Biosensors: Advances on the Optimization of Biocomposite Composition. *Microchem. J.* **2015**, *119*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.11.004>.
- (101) Shen, X.; Xia, X.; Du, Y.; Ye, W.; Wang, C. Amperometric Glucose Biosensor Based on AuPd Modified Reduced Graphene Oxide/Polyimide Film with Glucose Oxidase. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164* (6), B285–B291. <https://doi.org/10.1149/2.1591706jes>.
- (102) Wang, J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2001**, *13* (12), 983–988. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200108\)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::aid-elan983>3.0.co;2-%23).



# Capítulo 2

## Objetivos

---





## CAPÍTULO 2

### Objetivos

Uno de los principales objetivos de la Química Analítica es la detección y cuantificación selectiva de analitos a bajas concentraciones, en muestras cada vez más complejas. En este contexto, los sensores amperométricos ofrecen la posibilidad de desarrollo de sistemas de análisis cada vez más sensibles y económicos que permiten obtener la información de manera *in-situ* y en tiempo real. Nuestro grupo de investigación tiene una gran experiencia en el desarrollo de compósitos nanoestructurados utilizando materiales carbonáceos (*e.g* grafito, nanotubos de carbono, etc.) y su aplicación en el campo de los sensores electroquímicos. La proporción del material conductor en el nanocompósito resultante, es determinante para la optimización de las propiedades electroanalíticas del sensor final, por lo que el estudio de la composición y la distribución de las partículas conductoras en la matriz polimérica, ha sido uno de los retos principales a alcanzar en el grupo de investigación.

El grafeno, debido a sus excepcionales características eléctricas y la versatilidad que ofrece este material de ser funcionalizado con NPs metálicas, ha sido utilizado en el desarrollo de sensores y biosensores amperométricos nanocompósitos. El objetivo principal de esta Tesis ha sido el desarrollo de nuevos transductores y (bio)sensores electroquímicos utilizando como material conductor óxido de grafeno reducido (rGO). Para llevar a cabo este objetivo se ha sintetizado rGO mediante el método de Hummers, partiendo de diferentes tipos de grafito comercial. Posteriormente, se construyeron electrodos utilizando los materiales previamente sintetizados, desarrollando compósitos poliméricos nanoestructurados, realizando después un exhaustiva caracterización electroquímica, con el objetivo de encontrar un material de composición óptima desde el punto de vista electroquímico y electroanalítico. Otro objetivo ha sido la funcionalización del rGO con NPs metálicas como Ag, Au y Pd, y el estudio del efecto catalítico que estos metales poseen frente a la oxidación del  $H_2O_2$ . En este contexto, se desarrollaron estrategias de síntesis, junto con la aplicación de técnicas de caracterización electroquímicas y morfológicas, orientadas hacia el desarrollo e implementación de

nuevos materiales conductores en la construcción de transductores amperométricos. La aplicación sistemática de estas técnicas de caracterización, pretende demostrar la importancia que tienen las características morfológicas del grafito de partida en la síntesis de rGO. Estas características afectan a la morfología de las partículas sintetizadas de rGO y a las características eléctricas finales de los materiales compuestos nanoestructurados desarrollados en base a estas.

Se pretende estudiar el efecto electrocatalítico de los materiales preparados con rGO funcionalizado con nanopartículas metálicas y materiales híbridos, sobre la oxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos materiales serán utilizados en el desarrollo de biosensores de glucosa basados en la enzima glucosa oxidasa (GOD). Las características de respuesta de los nuevos biosensores serán estudiadas y comparadas respecto a los biosensores desarrollados con compósitos de rGO sin funcionalizar. Los objetivos específicos de esta Tesis doctoral son:

- Desarrollar un método de síntesis para la obtención de rGO a partir de grafito comercial. Se sintetizarán diferentes rGOs variando el grafito de partida, con el objetivo de estudiar las propiedades electroquímicas de los transductores fabricados con estos nanomateriales.
- Caracterizar y optimizar los electrodos basados en nanocompósitos de rGO/epoxi, teniendo en cuenta la naturaleza del rGO sintetizado y la composición de estos, con el objetivo de encontrar la mejor respuesta electroanalítica.
- Desarrollar una metodología de síntesis que permita la funcionalización de los transductores electroquímicos con NPs metálicas a través de diferentes rutas: a) síntesis intermatricial, utilizando un polímero de intercambio catiónico; b) funcionalización y reducción *in-situ* del GO con la sal precursora de la NP metálica, y posterior reducción obteniendo un material funcionalizado (M-NP@rGO).
- Evaluar el efecto electrocatalítico de los electrodos basados en nanocompósitos modificados con NPs metálicas y *bimetálicas* sobre la respuesta electroanalítica, dependiendo del metal o metales incorporados, de la cantidad de material conductor (rGO) y de la composición del transductor nanocompósito.
- Desarrollar un biosensor de glucosa basado en materiales compósitos nanoestructurados de rGO modificado con NPs *bimetálicas*, y su caracterización electroquímica para determinar la composición óptima que asegure una respuesta analítica mejorada.

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

---





## CAPÍTULO 3

### Materiales y Métodos

En este apartado se presentan las diferentes metodologías experimentales utilizadas durante el desarrollo de los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral.

En primer lugar, se detalla una breve descripción de los reactivos más comunes y disoluciones utilizadas, la síntesis de óxido de grafeno reducido (rGO) y funcionalización con NPs metálicas, así como la construcción de transductores y biosensores basados en nanocompuestos poliméricos de rGO y sus derivados.

En segundo lugar, se detallan los protocolos de caracterización de los nanomateriales sintetizados previamente y de los electrodos construidos durante esta tesis doctoral.

Finalmente, se detallan las condiciones experimentales utilizadas en la obtención de las medidas amperométricas de los diferentes sensores y biosensores desarrollados en el trabajo.

#### 3.1 Reactivos y disoluciones

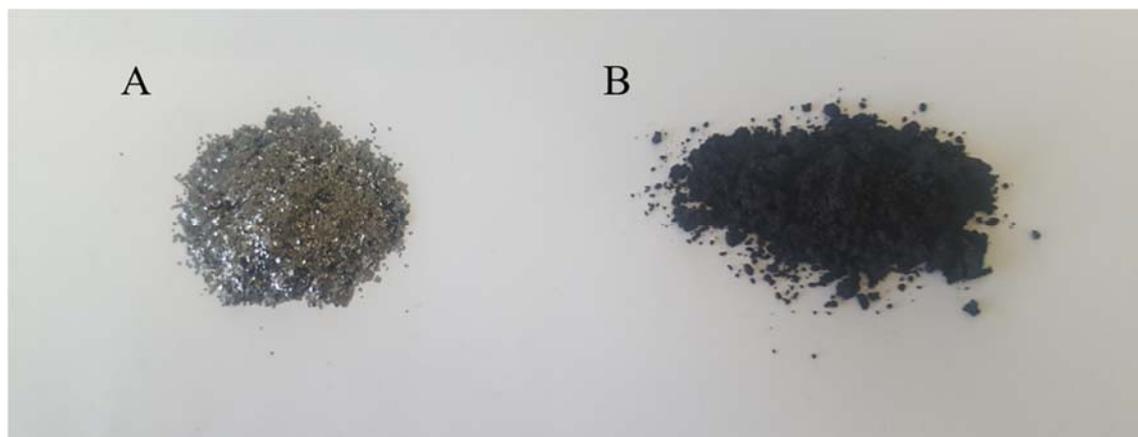
Para la síntesis de rGO se utilizaron dos tipos de grafito de características morfológicas distintas. Uno suministrado por Sigma-Aldrich y otro por Merck. De esta manera se obtuvo un material rGO1 utilizando grafito de Merck, y otro material rGO2 utilizando el grafito suministrado por Sigma-Aldrich.

Como material de refuerzo polimérico en la construcción de los electrodos, se utilizó una resina epoxy (Epotek H77A, y su correspondiente endurecedor H77B) suministrada por Epoxy Technology (Billerica, MA, USA). El cloruro de potasio (99,5 %), nitrato de potasio (99,5 %), hexacianoferrato (III) de potasio (99,5 %), hexacianoferrato (II) de potasio (99,5 %), dihidrogenofostato de potasio (99,5 %), hidrogenofostato de potasio (99,5 %), permanganato de potasio (99,99 %), ácido tetracloroáurico hidratado (> 99,99 %), tetraaminoplatinato de potasio (> 99,99 %), borohidruro de sodio (98 %), peróxido de hidrógeno (30 %), ácido sulfúrico (95-98 %), ácido nítrico (65 %) y ácido clorhídrico (30-35 %) fueron suministrados por Sigma-Aldrich y utilizados sin previo tratamiento. El peróxido de hidrógeno (30 %, Perhydrol<sup>®</sup>) utilizado, como analito de referencia en las diferentes técnicas electroquímicas, fue suministrado por Merck. La enzima Glucosa oxidasa (GOD) tipo VII de *Aspergillus niger* (174400 unidades/g), D- (+)-Glucosa ( $\geq 99,5$  %) fue suministrado por Sigma-Aldrich. La resina de intercambio catiónica (C100-E) fue suministrada por Purolite<sup>®</sup> (Purolite, Ibérica S.I., Barcelona, España). Las soluciones de peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico y glucosa fueron preparadas en agua Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) y utilizadas ese mismo día. Los tampones de fosfato utilizados fueron preparados a partir de sus sales correspondientes con agua Milli-Q, ajustando al pH deseado y fueron conservados a 4°C si su uso se prolongaba.

### 3.2 Síntesis de nanomateriales basados en óxido de grafeno reducido para la construcción de electrodos nanocompuestos

En este apartado se detallan los procedimientos de síntesis del rGO, la funcionalización del rGO con NPs metálicas, y la construcción de electrodos nanocompuestos. La síntesis del rGO se ha realizado partiendo de dos tipos de grafito diferentes dando lugar a rGO1 (Merck) y rGO2 (Sigma-Aldrich). El grafito de Merck presenta un aspecto físico en forma de polvo muy fino de color negro, mientras que el grafito de Sigma-Aldrich se presenta como *flakes* de grafito de color gris con un aspecto muy brillante (Figura 3.1).

Posteriormente, se detalla la funcionalización del rGO con NPs metálicas de Ag, Au, Pd y aleaciones de Au/Pd (NPs *bimetálicas*) para la construcción de electrodos nanocompuestos.



**Figura 3.1** Imagen de los dos tipos de grafito utilizados en las síntesis de rGO. Suministrado por Sigma-Aldrich (A) y por Merck (B).

### 3.2.1 Síntesis de grafeno oxidado y óxido de grafeno reducido

La síntesis de GO se llevó a cabo siguiendo el método de Hummers.<sup>1</sup> Se introducen 1 g de grafito, 0,5 g de  $\text{NaNO}_3$  y 23 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en un balón de fondo redondo con agitación moderada y se deja en un baño de hielo durante 15 min hasta que se disuelve completamente el  $\text{NaNO}_3$ . Posteriormente, se adicionan 3 g de  $\text{KMnO}_4$  muy lentamente en el medio de reacción. Una vez se ha añadido todo el  $\text{KMnO}_4$ , se retira el baño de hielo y se calienta hasta 45 °C durante 30 minutos. En este momento se puede observar el cambio de color de la reacción que pasa de negro a tener un marrón oscuro. Una vez la solución está a temperatura ambiente, se añaden 46 mL de agua Milli-Q y se deja la suspensión 15 minutos en agitación. La solución es posteriormente tratada con 140 mL de agua Milli-Q y 3,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para reducir el exceso de  $\text{MnO}_4^-$  y  $\text{MnO}_2$  a  $\text{MnSO}_4$ . La solución es lavada por centrifugación a 3500 rpm con una disolución de HCl al 10 % (hasta la completa eliminación de un sobrenadante viscoso de color amarillo, que corresponde a subproductos de la reacción). A continuación, se centrifuga todo el grafito oxidado (GrO) resultante con agua Milli-Q hasta conseguir un pH neutro. Finalmente, se deja secar el producto sólido en la estufa a 80 °C durante 24 horas (Figura 3.2). Previamente a obtener el rGO, se procede a la sonicación del GrO. Para ello se prepara una solución de 1 mg de GrO / mL agua Milli-Q y se deja sonicar durante 1 hora. A través

de este proceso se consigue que las láminas de GrO se encuentren dispersadas obteniendo una dispersión de GO en agua.



**Figura 3.2** Representación esquemática de las etapas de síntesis del rGO.

Posteriormente, se calienta esta solución a 95 °C y se la hace reaccionar con ácido ascórbico (2 mM). Previamente, se ajusta a un pH básico, (9 ~ 10), con una solución amoniacal al 25%. De esta manera se estabilizan las láminas de GO y se obtiene una dispersión estable debido a la repulsión electrostática entre las láminas. Para finalizar, se centrifuga el producto resultante a 3500 rpm y se lava con agua Milli-Q hasta llegar a un pH neutro. Posteriormente, se decanta el sobrenadante, y se procede al secado de las partículas de grafeno a una temperatura de 80 °C en la estufa durante 24 horas. El productor resultante es conservado alejado de la luz solar a temperatura ambiente.

### 3.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas metálicas

En este apartado se describen los procedimientos experimentales llevados a cabo para funcionalizar el rGO con NPs metálicas, obteniendo un nanomaterial híbrido, M-NP@rGO, que posteriormente será utilizado para la construcción de sensores y

(bio)sensores. El rGO se ha funcionalizado con NPs metálicas de Ag, Au y Pd, obteniendo Ag-NP@rGO, Au-NP@rGO y Pd-NP@rGO. También se funcionalizó el rGO con una aleación de Au/Pd obteniendo rGO funcionalizado con NPs *bimetálicas*: 1Au/2Pd- NP@rGO y 2Au/3Pd-NP@rGO y. Los coeficientes, previos a los elementos metálicos, hacen referencia a la relación molar de las sales precursoras utilizadas durante el proceso de síntesis. En este proceso se ha utilizado únicamente el grafeno sintetizado rGO2.

### 3.2.2.1 Funcionalización del óxido de grafeno reducido con nanopartículas de plata

En un balón de fondo redondo se añaden 350 mg de GrO, 250 mL de agua Milli-Q y se deja sonicar 1 hora para obtener una buena dispersión de las láminas de GO. Posteriormente, se añaden 0,425 g de AgNO<sub>3</sub> ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  moles) y se deja agitando durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se añaden 250 mL de una solución de NaBH<sub>4</sub> (0,1M), gota a gota y recién preparada, y se deja una hora más en agitación, favoreciendo así el crecimiento de las AgNPs en la superficie del rGO. Finalmente, se centrifuga y se lava el producto resultante con agua Milli-Q hasta llegar a un pH neutro. El producto sólido se seca en la estufa a 80 °C durante 24 horas. El producto es conservado fuera de la luz solar, a temperatura ambiente.

### 3.2.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de oro

Análogamente al procedimiento anterior se introducen 350 mg de GrO en 250 mL de agua Milli-Q y se deja sonicando durante 30 minutos. Posteriormente, se añaden 393,83 mg de HAuCl<sub>4</sub> ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  moles) y se deja agitando a temperatura ambiente. A esta solución se le adicionan 250 mL de una solución acuosa reductora 0,1 M de NaBH<sub>4</sub> (la adición ha de ser gota a gota). Finalmente, se deja la reacción agitando 1 hora más, facilitando así la formación de las NPs de Au sobre la superficie del rGO. Para finalizar, el producto es centrifugado y lavado hasta llegar a un pH neutro. Las partículas funcionalizadas, son secadas en la estufa a 80 °C durante 24 horas. El producto es conservado alejado de la luz solar y a temperatura ambiente.

### 3.2.2.3 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de paladio

En un balón de 500 mL que contiene 350 mg de GrO y 250 mL de agua Milli-Q, previamente sonicado durante una hora, se introducen 0,329 g de  $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_2$  ( $1,25 \cdot 10^{-3}$  moles) y se deja agitar durante 30 minutos. Posteriormente, se añaden 250 mL de una solución de  $\text{NaBH}_4$  (0,1M) gota a gota y una vez finalizada la adición, se deja reaccionar 1 hora con agitación. Para finalizar, se centrifuga y se lavan las partículas resultantes con agua Milli-Q hasta llegar a un pH neutro. Por último, el producto es secado a  $80^\circ \text{C}$  en la estufa durante 24 horas. El producto es conservado a temperatura ambiente y alejado de la luz solar.

### 3.2.2.4 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de oro y paladio

Se han sintetizado dos nanomateriales híbridos de rGO modificados con NPs *bimetálicas* de Au y Pd, variando la ratio de concentraciones de las sales precursoras en el medio de reacción (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Funcionalización de rGO con dos ratios de concentraciones diferentes de NPs metálicas de Au y Pd.

Material	[Au]	[Pd]	Ratio [Au]/[Pd]
2Au/3Pd-NP@rGO	3,33 mM	5 mM	2:3
1Au/2Pd-NP@rGO	2,5 mM	5 mM	1:2

En un balón de 250 mL, se introducen 140 mg de GrO y 100 mL de agua Milli-Q y se deja sonicar durante 1 hora. Posteriormente, se añade la sal de Au y se deja agitar durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añade la sal de Pd y se deja la suspensión durante 30 minutos más bajo agitación constante, para conseguir una mezcla de sales lo más homogénea posible. Posteriormente, se añaden 100 mL de una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (0,1M) gota a gota. Al finalizar la adición, se deja reaccionar durante 1 hora con agitación vigorosa, para favorecer el crecimiento de las NPs *bimetálicas* de Au y Pd. Posteriormente, se centrifuga y se lava el producto resultante con agua Milli-Q hasta llegar a pH neutro. El producto es secado a  $80^\circ \text{C}$  en la estufa durante 24 horas. El producto es conservado a temperatura ambiente, alejado de la luz solar.

### 3.3 Síntesis intermatricial de nanopartículas metálicas

Con el objetivo de construir electrodos nanocompuestos modificados con NPs metálicas se utilizó la técnica de síntesis intermatricial utilizando una resina catiónica (C100-E). Esta resina contiene grupos sulfónicos ( $R-SO_3$ ) en la estructura que permiten su funcionalización con cationes metálicos y la posterior reducción de estos cationes.<sup>2-4</sup>

Esta técnica permite obtener NPs en forma de polvo, para que posteriormente puedan ser incorporadas y dispersadas en el nanocompuesto durante la preparación de la mezcla de pasta nanocompuesta antes del proceso de curado de la misma.

Las NPs fueron sintetizadas sobre una resina de intercambio catiónica con grupos  $R-SO_3$ , para posteriormente ser calcinada y obtener NPs en forma de polvo. Mediante esta estrategia se obtuvieron NPs de Ag y Au. En el caso de las NPs de Ag se sintetizaron directamente adicionando la sal correspondiente sobre la resina, y en el caso de las NPs de Au se realizó un intercambio galvánico previamente con NPs de Cu.

#### 3.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando la resina catiónica C100- E

En un balón de fondo redondo se introducen 377,5 mg de  $AgNO_3$  y 20 mL de agua Milli-Q, y se deja en agitación hasta su completa disolución. Posteriormente, se introducen 400 mg de resina catiónica, C100-E, y se mantiene en agitación durante 20 minutos para favorecer la carga de los grupos sulfónicos con el catión  $Ag^+$ . Posteriormente, se limpia la resina con agua Milli-Q para eliminar todo el exceso de  $Ag^+$  que haya quedado en solución. Finalmente, se vierte la resina sobre 20 mL de una solución de  $NaBH_4$  (0,1M) y se deja una hora bajo agitación. Inicialmente, la resina se vuelve de un tono grisáceo y finalmente adopta un color amarillo pálido, indicando la formación de NPs en la superficie de la resina. Para obtener el polvo de NPs de Ag, la resina se calcina durante 6 horas a 550 °C. el producto es conservado en un vial a temperatura ambiente, fuera de la exposición de la luz.

### 3.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro utilizando la resina catiónica C100-E

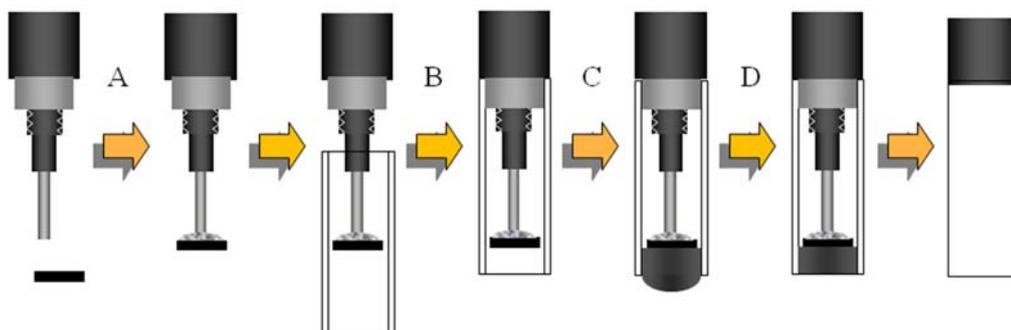
En un balón de fondo redondo se introducen 1,48 g de  $\text{CuSO}_4$  y 60 mL de agua Milli-Q, y se deja agitando hasta que la sal se haya disuelto completamente. Una vez se ha disuelto todo el  $\text{CuSO}_4$ , se introduce 1,08 g de la resina C100-E y se deja la mezcla 30 minutos en agitación para que se carguen los grupos de la resina con cationes  $\text{Cu}^{2+}$ . A continuación, se limpia por decantación la resina con agua Milli-Q y se vierten  $\approx 60$  mL de una solución de  $\text{NaBH}_4$  0,1M. Posteriormente se limpia la resina nuevamente con agua Milli-Q para eliminar el exceso de  $\text{NaBH}_4$  y se vierte sobre una solución de  $\text{HAuCl}_4$  0,01M, dejando la mezcla agitando durante dos horas favoreciendo así el intercambio galvánico de Cu por Au. Finalmente se lava y se filtra el producto con agua Milli-Q. Una vez seco, el producto es conservado a temperatura ambiente y alejado de la luz.

## 3.4 Construcción de electrodos nanocompuestos

La construcción de los electrodos nanocompuestos fue preparada mezclando la proporción deseada de rGO con una resina epoxy constituida por una proporción 20:3 (w/w) del polímero Epotek H77 y su correspondiente endurecedor H77B. Esta mezcla se homogeniza mecánicamente durante 1 hora, obteniendo una pasta con un aspecto más gris cuanto mayor es la carga de material conductor que contiene. Para la construcción de los electrodos, la pasta se deposita en un tubo de PVC de 21 mm de largo y 6 mm de diámetro interno. El tubo contiene un conector eléctrico soldado a una fina lámina de cobre. Esta lámina de cobre se ha lavado previamente con una solución de ácido nítrico (1:1) para eliminar el óxido de cobre presente en la superficie y así facilitar el paso de la corriente eléctrica. El conector eléctrico soldado a la lámina de cobre es introducido en el tubo de PVC dejando una cavidad de 3 mm de profundidad la cual es donde irá alojado el nanocompuesto. El proceso de construcción se puede observar en la Figura 3.3.

Una vez introducido el material compuesto dentro del tubo de PVC, se lleva a cabo el proceso de curado del electrodo, el cual consiste en dejar el electrodo en la estufa 24 horas a  $80^\circ\text{C}$ . El tiempo y temperatura se modifican en el caso de electrodos que incorporan una enzima en el nanocompuesto, dejándose curar en la estufa 4 días a una temperatura de

40 °C para evitar la desnaturalización de la enzima. Una vez curados los electrodos es necesario que, la superficie de estos, pase por un proceso de pulimento mediante diferentes papeles abrasivos, empezando por el papel de vidrio de grano grueso (800) y, progresivamente, utilizando otros papeles de un grano más fino (1200). El pulido final se realiza con papel de alúmina de 3 mm (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). La superficie de los electrodos nanocompuestos construidos tienen un área geométrica de 28 mm<sup>2</sup>. Este proceso de construcción de los electrodos se repite para cada una de las composiciones estudiadas.



**Figura 3.3** Etapas de construcción del electrodo nanocompuesto. Se suelda una lámina de cobre al conector hembra de 2mm (A). Se introduce el conector dentro del tubo de PVC (B). Se rellena la cavidad con el material nanocompuesto (C). Finalmente, se pule la superficie del electrodo (D).

### 3.4.1 Construcción de electrodos nanocompuestos basados en nanocompuestos de rGO funcionalizado con NPs metálicas

Se construyeron diferentes electrodos nanocompuestos basados en M-NP@rGO, utilizando como matriz polimérica la resina Epotek H77 (kit A+B). Estos electrodos fueron fabricados utilizando mezclas de rGO sin funcionalizar y M-NP@rGO. En la Tabla 3.2 se detallan los diferentes electrodos construidos y la proporción de material conductor utilizado en cada caso.

Donde, rGO es el grafeno obtenido a partir del grafito comercial de Sigma-Aldrich (rGO2). Para simplificar, se ha omitido esta distinción de la nomenclatura de los transductores nanocompuestos desarrollados.

**Tabla 3.2** Relación de los diferentes transductores nanocompuestos construidos y sus correspondientes porcentajes de material conductor. \* En relación 2:3 para Au/Pd

<b>Electrodo</b>	<b>rGO (%)</b>	<b>M-NP@rGO (%)</b>	<b>Epotek H77 (%)</b>
<b>Ag-NP@rGO</b>	10	2	88
<b>Au-NP@rGO</b>	12	2	86
<b>Pd-NP@rGO</b>	10	3	87
<b>1Au/2Pd-NP@rGO</b>	10	3	87
<b>2Au/3Pd-NP@rGO</b>	10	3	87
<b>2Au/3Pd-NP@rGO</b>	11	3	86
<b>Au-NP@rGO plus</b>	10	3	87
<b>Pd- NP@rGO*</b>			

#### 3.4.1.1 Construcción de los biosensores de glucosa oxidasa

Se fabricaron diferentes biosensores de glucosa variando siempre la cantidad de material conductor y fijando la cantidad de enzima GOD en 1 %. El proceso de construcción es el mismo que el detallado en el apartado anterior (§ 3.4). Sin embargo, en el proceso de curado se modificó la temperatura de curado a 40 °C durante 4 días para evitar la desnaturalización de la enzima glucosa oxidasa. En la Tabla 3.3 se detallan los diferentes electrodos construidos y sus composiciones.

**Tabla 3.3** Relación de los biosensores de glucosa y sus correspondientes porcentajes de rGO, 2Au/3Pd-NP@rGO, y porcentaje de GOD utilizado en la construcción de los biosensores.

<b>Electrodo</b>	<b>rGO (%)</b>	<b>M-NP@rGO (%)</b>	<b>GOD (%)</b>
<b>GOD@rGO<sub>13%</sub></b>	13	-	1
<b>2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub></b>	10	3	1
<b>2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub></b>	11	3	1

Se prepararon biosensores de GOD utilizando rGO sin modificar, y biosensores con mezclas del material híbrido 2Au/3Pd-NP@rGO y rGO en diferentes proporciones. Para simplificar la nomenclatura se ha omitido el número **2**, correspondiente a grafeno sintetizado a partir de grafito de Sigma-Aldrich.

### 3.5 Técnicas de caracterización e instrumentación

En este apartado se detallan las diferentes técnicas e instrumentos utilizados para la caracterización morfológica de los nanomateriales sintetizados en esta tesis doctoral.

#### 3.5.1 Microscopia electrónica

Las micrografías de las partículas de rGO fueron obtenidas mediante la técnica de microscopia electrónica de alta resolución (TEM). Las imágenes de rGO1 y rGO2 fueron registradas con el microscopio JEM-1400 a una aceleración de voltaje de 120 kV. Esta técnica permite determinar el grado de exfoliación del grafeno obtenido y observar los defectos estructurales en la superficie del nanomaterial. Para caracterizar el rGO funcionalizado con NPs metálicas se utilizó el microscopio FEI Tecnai G2 F20 S-TWIN a una aceleración de voltaje de 200 KV acoplado con un detector EDX. Este microscopio permite observar mejor las NPs sobre el rGO ya que tiene una mayor resolución espacial. A su vez, permite confirmar la presencia de dicho metal sobre las láminas de rGO gracias al detector EDX.

Para la caracterización de las partículas de grafeno, se introduce 1 mg aproximado del material en un vial de 5 ml y se deja en un baño de ultrasonidos durante 1 hora. Posteriormente, se depositan 1 o 2 gotas de la suspensión sobre una lámina de *Holy Carbon* y se espera a que se seque por completo, antes de introducir la muestra en el microscopio electrónico con una aceleración de voltaje de 120 KV. En el caso del rGO funcionalizado con NPs, el procedimiento es el mismo salvo que la muestra es introducida en el microscopio operando a 200 KV. En ambos casos, es necesario obtener suficientes imágenes para tener una idea representativa de las características del material sintetizado y poder determinar el tamaño, y la dispersión de las NPs en la superficie de rGO.

#### 3.5.2 Análisis termogravimétrico

Esta técnica fue utilizada para cuantificar la cantidad total de metal depositado sobre las láminas de rGO. Los experimentos se llevaron a cabo usando un instrumento Netzsch, modelo STA 449 F1 Jupiter<sup>®</sup>. El rGO funcionalizado se introduce en una pequeña balanza

(5 mg aproximadamente). Posteriormente la muestra es calentada hasta 1000 °C con una rampa de 5 °C/min usando un flujo de aire. La masa es continuamente medida en función de la temperatura, y la velocidad de pérdida de masa es automáticamente registrada.

### 3.5.3 Técnicas espectroscópicas

La espectroscopia Raman fue utilizada para verificar la formación de GO y, posteriormente, rGO debido a la dispersión Raman característica de los picos asociados a los grupos funcionales específicos del GO y rGO. El espectro Raman se realizó con un instrumento Raman Renishaw 1000 unido a un microscopio Leica con un software de análisis Grams Research™. La fuente de excitación utilizada fue de 633 nm con un láser Hene (Renishaw RL633). El objetivo de la lente de 50 aumentos fue capaz de establecer un foco de 2,3 μm de diámetro. El espectrofotómetro fue calibrado antes de su uso, usando como referencia una oblea de silicio centrada a 520 cm<sup>-1</sup>.

Por otro lado, la caracterización óptica del GO y rGO durante su síntesis fue seguida mediante espectroscopia UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis, como espectrofotómetro).

## 3.6 Caracterización y evaluación de los diferentes electrodos y biosensores construidos

En este apartado se describe la caracterización de los diferentes sensores y biosensores construidos durante esta Tesis. Para ello se han utilizado diferentes técnicas eléctricas, electroquímicas y electroanalíticas. También se detallan las condiciones experimentales utilizadas en la aplicación de las técnicas citadas anteriormente.

### 3.6.1 Caracterización eléctrica. Curva de percolación

Las características eléctricas de las dos baterías de electrodos construidos con rGO1 y rGO2 fueron estudiadas según la teoría de la percolación. Para llevar a cabo este experimento, se midió la resistencia de la superficie de las dos series de electrodos con un multímetro comercial. Se prepararon electrodos con composiciones que comprenden entre 8 % y 13 % de rGO1, sintetizado a partir de grafito suministrado por Merck, y entre 8 % y 16 % de rGO2, sintetizado a partir de grafito suministrado por Sigma- Aldrich. Después de construir, curar y pulir los electrodos, se introduce un terminal del multímetro en el conector eléctrico del electrodo y el otro terminal en la superficie del electrodo, entonces se realiza un *scanning* lo más homogéneo posible de la superficie (10 puntos mínimo) determinando la resistencia en cada punto. Para cada electrodo, se determina la resistencia promedio. Para determinar la curva de percolación, se realiza una representación gráfica de la resistencia promedio de cada electrodo determinada por triplicado, frente al tanto por ciento de material conductor presente en el nanocompuesto.

### 3.6.2 Voltamperometría cíclica

Las voltamperometrías cíclicas (*Cyclic Voltammetry, CV*) han sido realizadas con un potenciostato/galvanostato Autolab (PGSTAT204). Se utilizó un sistema de 3 electrodos: trabajo, auxiliar y referencia. Como electrodo auxiliar se ha utilizado un electrodo comercial de platino 52-671 Crison (Crison Instruments, Barcelona, España). Como electrodo de referencia se ha utilizado un electrodo de Ag/AgCl, construido para la aplicación, que consiste en un hilo de plata, en el que se ha electrodepositado AgCl. El potencial de este electrodo se mantuvo constante gracias a un fondo iónico de KCl 0,1M. Como electrodo de trabajo se utilizaron los diferentes electrodos construidos basados en nanocompuestos de grafeno. Estos experimentos se han realizado para caracterizar electroquímicamente los sensores y biosensores.

Los voltamperogramas fueron realizados con una solución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  0,1M, con un barrido de potencial comprendido desde -1,0 V hasta 1,0 V vs. Ag/AgCl. La velocidad de barrido fue de 10 mV/s y se mantuvo siempre constante. Estos experimentos, permiten obtener los valores de los diferentes parámetros electroquímicos de los electrodos como

son: la altura de pico ( $I_p^c$ ,  $I_p^a$ ), la intensidad de intercambio ( $i_0$ ), los potenciales catódicos y anódicos ( $E_c$  y  $E_a$ ), el potencial de equilibrio ( $E^0$ ), la separación entre los potenciales de pico catódico y anódico ( $\Delta E$ ), el área electroactiva ( $A$ ) y la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{ct}$ ).

### 3.6.3 Espectroscopia electroquímica de impedancia

Estos experimentos se llevaron a cabo con el mismo potenciostato/galvanostato Autolab (PGSTAT204) que incluye un módulo de impedancia. El sistema de tres electrodos (auxiliar, referencia y trabajo) son los mismos que los utilizados en el apartado anterior. El par redox de referencia utilizado también fue el mismo que en las medidas de CV. Se utilizó una disolución que contenía la pareja de sales del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  0,1M y un fondo iónico de KCl 0,1M. Las medidas se realizaron a un potencial de 0,16 V y el intervalo de frecuencias utilizado estuvo comprendido entre 100 KHz y 0,1 KHz.

### 3.6.4 Voltamperometría de barrido lineal

Para el estudio de los potenciales óptimos de trabajo, se utilizó la voltamperometría de barrido lineal. El instrumento utilizado fue un potenciostato/galvanostato Autolab (PGSTAT204). La celda electroquímica se compone de tres electrodos: auxiliar, referencia y trabajo. Como electrodo auxiliar se utilizó un electrodo comercial de platino 52-671 Crison (Crison instruments, Barcelona, España). Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de unión simple Ag/AgCl ORION 900200 (Thermo Electron Corporation, Beverly, MA, USA). Como electrodo de trabajo se utilizaron los diferentes electrodos nanocompuestos desarrollados durante esta tesis doctoral.

Dicha técnica consiste en la aplicación de un barrido de potencial en una dirección determinada a velocidad constante, registrando simultáneamente la intensidad a cada potencial aplicado. Estas medidas se realizaron en ausencia de agitación. Para cada uno de los electrodos se realizó un barrido de potencial comprendido entre 0,0 V y 1,0 V a una velocidad de barrido de 10 mV/s. Los experimentos se realizaron utilizando 25 mL de PBS 0,1 M a un pH de 7,0. Se realizaron diferentes barridos con sucesivas adiciones de un patrón de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 M. Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  medidas fueron 4 mM, 8 mM,

12 mM, 16 mM, 20 mM y 23 mM, determinándose el incremento de la intensidad de corriente al aumentar la concentración de analito.

### 3.6.5 Caracterización electroanalítica

Para evaluar la respuesta electroanalítica de los sensores y biosensores construidos durante esta tesis doctoral, se utilizó la amperometría hidrodinámica como técnica electroanalítica. Esta técnica electroquímica mide la intensidad de corriente para diferentes concentraciones de analito bajo la aplicación de un potencial de trabajo constante. Estas medidas se realizaron con una unidad amperométrica LC-4C de la marca comercial BAS (Bioanalytical Systems Inc, West Lafayette, IN, USA). Se utilizó una celda electroquímica compuesta por tres electrodos. Un electrodo auxiliar comercial de platino 52-671 Crison (Crison Instruments, Barcelona, España). Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo comercial de unión simple Ag/AgCl ORION 900200 (Thermo, Electron Corporation, Beverly, MA, USA), y como electrodo de trabajo se utilizaron los diferentes sensores y biosensores construidos durante este trabajo.

Los potenciales de trabajo aplicados para cada especie analizada fueron previamente determinados por voltamperometría de barrido lineal. Una vez aplicado el potencial, se procedió a la estabilización de la línea base y, seguidamente, se registró la intensidad de corriente para diferentes adiciones sucesivas de una disolución patrón del analito, sobre un fondo electrolítico de PBS 0,1M a pH de 7,00. Los analitos estudiados fueron el ácido ascórbico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la D-(+)-Glucosa.

## 3.7 Bibliografía

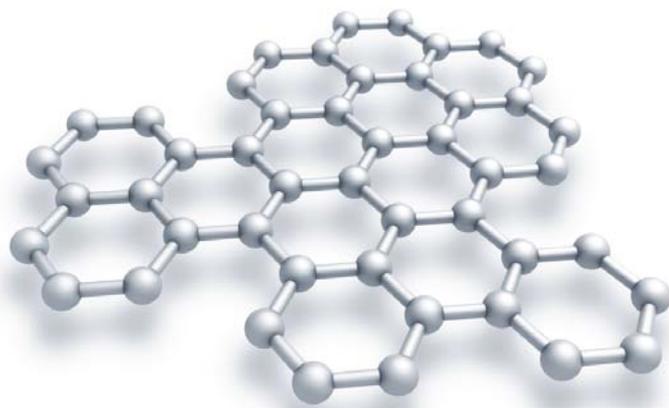
- (1) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339.
- (2) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Vigués, N.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Mas, J.; Baeza, M.; Muñoz, M. Intermatrix Synthesis of Ag, AgAu and Au Nanoparticles by the Galvanic Replacement Strategy for Bactericidal and Electrocatalytically Active Nanocomposites. *New J. Chem.* **2016**, *40* (12), 10344–10352.

- (3) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Stenbock-Fermor, A.; Muñoz, M.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Tsarkova, L. A.; Baeza, M. Intermatrix Synthesis as a Rapid, Inexpensive and Reproducible Methodology for the in Situ Functionalization of Nanostructured Surfaces with Quantum Dots. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *368*, 417–426.
- (4) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, M.; Ruiz, P.; Muraviev, D. N. Morphological Changes of Gel-Type Functional Polymers after Intermatrix Synthesis of Polymer Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 1–4.

# Capítulo 4

Síntesis de óxido de grafeno reducido para la fabricación de transductores nanocompuestos

---





## CAPÍTULO 4

### **Síntesis de óxido de grafeno reducido para la fabricación de transductores nanocompuestos**

Desde hace bastantes años, los nanocompuestos basados en materiales carbonáceos-resina epoxy se han utilizado en nuestro grupo de investigación como material transductor.<sup>1,2,3</sup> Durante todo este tiempo se han desarrollado sensores y biosensores basados en grafito y nanotubos de carbono como material conductor, utilizando una resina epoxy no conductora como matriz o material de refuerzo.<sup>4,5,6</sup> En los trabajos realizados anteriormente se optimizó la cantidad de grafito como material conductor en el compuesto grafito-epoxy.<sup>1,7,8</sup> Esta optimización se realizó en base a las propiedades electroquímicas finales de los materiales transductores y no solo teniendo en cuenta la conductividad eléctrica de éstos. Más recientemente han sido desarrollados sensores y biosensores utilizando nanotubos de carbono como material conductor.<sup>9</sup> Estos transductores fueron caracterizados teniendo en cuenta las propiedades físicas de los nanotubos de carbono, como pueden ser tamaño y longitud, así como su composición.<sup>10</sup> Esta se optimizó mediante un estudio electroquímico completo que permitió definir la cantidad y la distribución óptima del material conductor en el nanocompuesto que aseguraba las mejores propiedades electroanalíticas del (bio)sensor final.<sup>11</sup> En este estudio también se desarrollaron métodos sintéticos para funcionalizar el material conductor de partida, nanotubos de carbono, con nanopartículas metálicas.<sup>12,5</sup> Dicha funcionalización permite, por un lado, mejorar la respuesta analítica de los (bio)sensores ya que provoca un efecto sinérgico en su respuesta aumentando la capacidad catalítica del material y, por otro, abre una vía posible para la modificación del material transductor con material de reconocimiento biológico que permite incrementar la selectividad y sensibilidad del (bio)sensor final.

Desde el aislamiento de una sola lámina de grafeno por Konstantin Novoselov y Andre Geim<sup>13</sup> diferentes grupos de investigación han estudiado sus propiedades electrónicas y durante el primer cuarto del siglo XXI este material ha despertado un gran interés en la comunidad científica.<sup>14,15,16</sup> Debido a la alta conductividad eléctrica, estabilidad térmica y excelentes propiedades mecánicas, el grafeno y sus derivados se han convertido en excelentes candidatos para el desarrollo de nanocompuestos poliméricos conductores.<sup>17,18</sup> Desde el punto de vista electroquímico, el grafeno tiene numerosas características como una alta área superficial específica, una excelente conductividad y la posibilidad de funcionalizar la superficie con un gran abanico de nanopartículas (NPs).<sup>19</sup> Un importante miembro de la familia del grafeno es el óxido de grafeno reducido (rGO), el cual es electroquímicamente más activo si se compara con el grafeno prístino.<sup>20,21</sup> Esto se debe a la presencia de grupos reactivos que contienen oxígeno en los bordes y en sus planos basales, que confieren a los electrodos basados en rGO una mayor sensibilidad y actividad electrocatalítica, debido a las altas conductividades asociadas al aumento de orbitales  $sp^2$ .<sup>22,23</sup>

Se ha establecido un protocolo de síntesis de rGO utilizando como material de partida dos tipos distintos de grafito comercial. Estos materiales muestran diferencias físicas significativas que influirán notablemente en las características electrónicas del rGO sintetizado y, consecuentemente, estas diferencias se verán reflejadas en los transductores construidos.<sup>24,25</sup> De este modo se caracterizará el rGO sintetizado, óptica y morfológicamente, con el propósito de obtener un material conductor útil, económico desde el punto de vista de los costes de producción y escalable para el desarrollo de sensores amperométricos.

Como se ha mencionado anteriormente, las características y propiedades electroquímicas de los transductores nanocompuestos de grafeno, no sólo dependen de las propiedades y la calidad del material conductor obtenido, sino también de la composición y dispersión del material conductor en la matriz del nanocompuesto.<sup>2</sup> La conductividad eléctrica del material transductor es uno de los cambios más importantes que se producen cuando varía la composición en el nanocompuesto. La conductividad puede aumentar varios órdenes de magnitud dependiendo de la cantidad de material conductor, en este caso rGO, en el nanocompuesto final. Dependiendo de la distribución de las partículas conductoras en la matriz, el nanocompuesto puede comportarse como un haz de microelectrodos o como un macroelectrodo. El comportamiento como haz de microelectrodos, mejora las

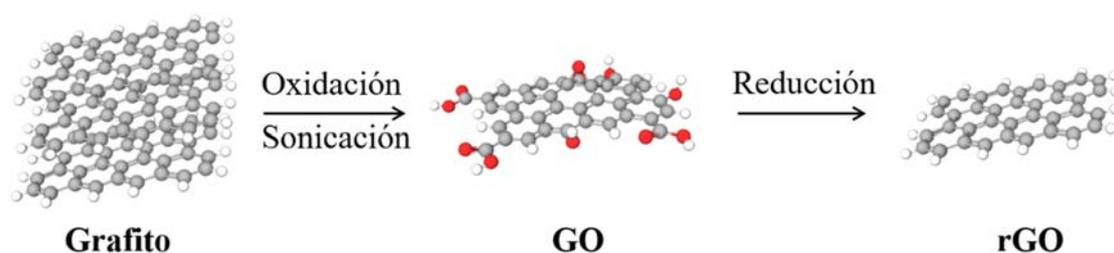
propiedades electroquímicas del electrodo al proporcionar un transporte de masa más eficiente de la especie electroactiva. Esto se debe, a la difusión radial que experimenta el analito desde el seno de la solución hacia las partículas de material carbonáceo distribuidas aleatoriamente en la superficie del electrodo. Dicha difusión radial, predomina respecto a la difusión axial del analito, favoreciendo de esta manera un aporte extra de masa, y mejorando las propiedades electrolíticas de respuesta del sensor. La optimización de la carga de rGO en el nanocompuesto produce una dispersión óptima del material conductor que es de vital importancia para mejorar las propiedades electroquímicas y electroanalíticas del sensor final.

#### 4.1 Síntesis de grafeno oxidado y óxido de grafeno reducido

La síntesis de grafeno oxidado (GO) se ha realizado mediante el método de Hummers.<sup>26</sup> Este método de síntesis permite obtener rGO con un alto grado de exfoliación. Esto es debido a que durante la síntesis se introducen un gran número de defectos estructurales y electrónicos que beneficiarán las características electroquímicas del nuevo nanomaterial.<sup>22</sup> El método consiste en oxidar el grafito en un medio ácido con  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  utilizando como agente oxidante el  $\text{KMnO}_4$ . Durante este proceso se consigue introducir grupos oxidados (cetonas, ácidos carboxílicos, epoxi, hidroxilos) en los bordes y el interior del grafito, consiguiendo una mayor distancia interlaminar debido a las repulsiones estéricas y electroestáticas de los grupos introducidos. Mediante el uso de ultrasonidos, se consigue exfoliar el grafito oxidado (GrO) obteniendo una dispersión de láminas de GO. Este método permite obtener las suficientes cantidades de GO y rGO para el desarrollo de sensores y transductores electroquímicos basados en nanocompuestos de rGO. Como se ha mencionado en el capítulo 1, este grafeno oxidado no presenta las mejores características electroquímicas para la construcción de sensores (electrónicas, fuerza, conductividad térmica y área superficial), pero si permite obtener las cantidades adecuadas a un precio de coste muy inferior a otras técnicas sintéticas como el crecimiento epitaxial, la deposición química de vapor, etc. Una vez sintetizado el GO, es necesaria la reducción total de los grupos oxidados con el objetivo de mejorar las características electrónicas del material conductor, y así poder ser utilizado en la

construcción de sensores amperométricos. De esta manera, el GO se reduce a rGO utilizando como agente reductor el ácido ascórbico (AA) en un pH básico. En la bibliografía se encuentran un gran número de agentes reductores capaces de reducir el GO a rGO. En este trabajo se utilizó el AA, ya que concede al nanomaterial unas propiedades óptimas desde el punto de vista electrónico.<sup>27</sup> El uso de AA elimina los grupos oxidados de la superficie del GO, dando lugar a rGOs con una alta área superficial. Su uso también nos permite trabajar en soluciones acuosas y es un reactivo *green* desde el punto de vista ecológico. En la Figura 4.1 se puede ver un esquema del proceso de formación del GO y posterior reducción para obtener rGO.

Se adquirieron dos lotes distintos de grafito. Se utilizará la nomenclatura rGO1 y rGO2 para diferenciarlos entre ellos. Los procedimientos de síntesis utilizados, tanto en la oxidación como en la reducción, fueron los mismos en ambos casos.

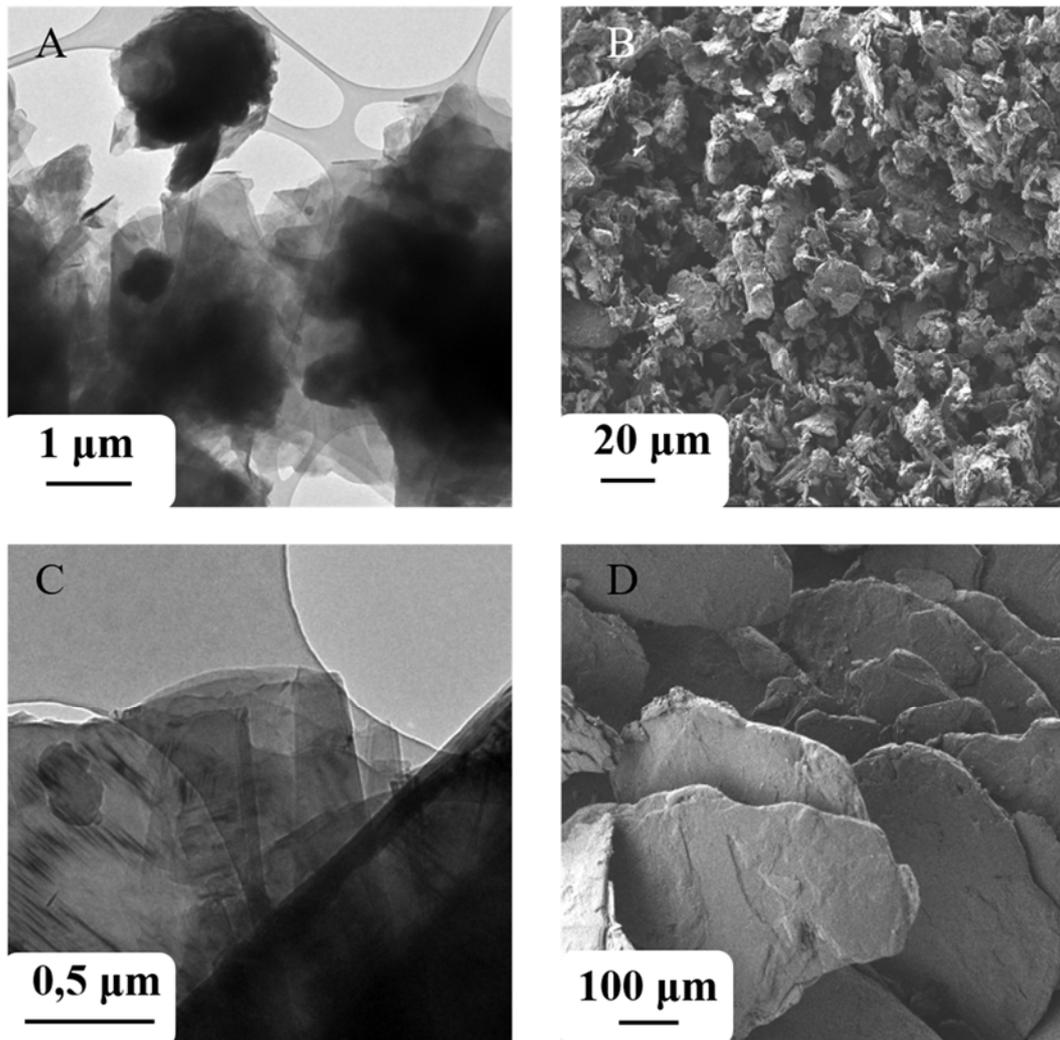


**Figura 4.1** Representación esquemática de la obtención de GO y rGO.

#### 4.1.1 Caracterización morfológica del material de partida

Previamente a la síntesis de rGO se procedió a la caracterización morfológica del material de partida utilizado. En concreto, se utilizaron dos tipos diferentes de grafito de características físicas distintas procedentes de dos suministradores distintos: Sigma Aldrich y Merck. En la Figura 4.2 (A y B) se puede observar las micrografías TEM y SEM del grafito suministrado por Merck (grafito 1). Este material poroso, se presenta en forma de un polvo fino y de color negro a diferencia del grafito de Sigma-Aldrich (grafito 2) que se presenta en forma de copos o *flakes*. Como se puede observar en la Figura 4.2 el grafito de Merck está altamente dividido comparado con el grafito suministrado por Sigma-Aldrich (Figura 4.2 (C y D)) que presenta una estructura laminar superior. Estas diferencias morfológicas observadas, entre ambos materiales de

grafito, podrían afectar al método de síntesis y no hacerlo reproducible ni extrapolable a otros materiales gráfiticos.

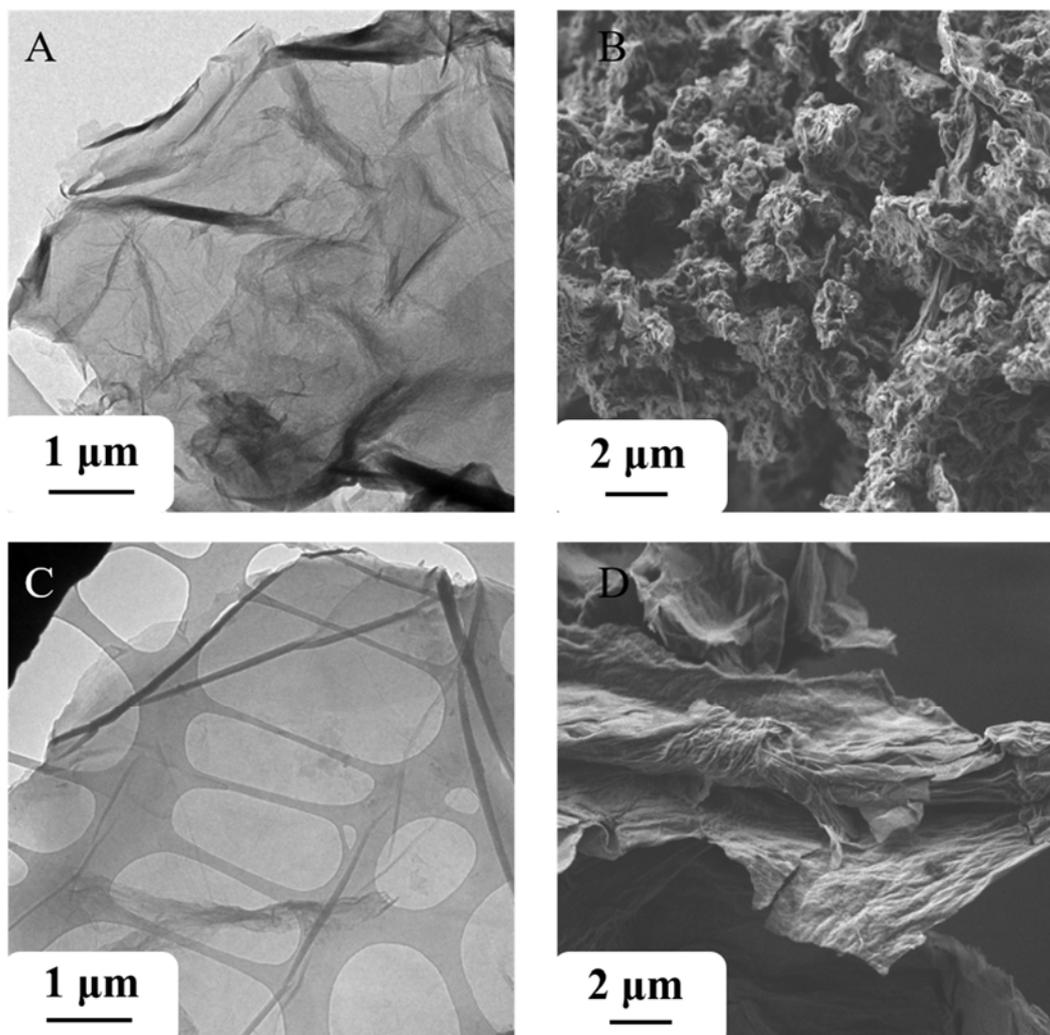


**Figura 4.2** Micrografías de los dos tipos de grafito utilizados. Micrografías TEM y SEM del grafito 1 suministrado por Merck (A, B). Micrografías TEM y SEM del grafito 2 suministrado por Sigma-Aldrich (C y D).

#### 4.1.2 Caracterización morfológica del óxido de grafeno reducido

Una vez sintetizados ambos rGOs, estos fueron caracterizados mediante microscopía electrónica con el objetivo de visualizar la morfología del nanomaterial obtenido a partir de los dos tipos de grafito de partida utilizados. En la Figura 4.3 (A y B) se pueden observar las micrografías TEM y SEM del rGO1 sintetizado a partir de grafito 1 proveniente de Merck. En la Figura 4.3 (C y D) se observa la estructura morfológica del material sintetizado (rGO2) a partir de grafito 2 suministrado por Sigma-Aldrich. Si se analizan las micrografías TEM de ambos materiales no se aprecian diferencias

significativas. Esto puede ser debido a que la preparación de la muestra consiste en una suspensión relativamente diluida del material sintetizado a estudiar. Por otro lado, las micrografías SEM muestran una gran diferencia en lo que a su estructura se refiere. En la Figura 4.3 (B y D) se puede observar como el rGO1 sintetizado a partir de grafito 1 (proveniente de Merck) presenta una estructura mucho más globular que el rGO2 sintetizado a partir de grafito 2 (proveniente de Sigma-Aldrich). El rGO2 (figura 4.3 (C y D)) presenta una estructura altamente laminar propia de láminas de rGO.



**Figura 4.3** Micrografías de los dos tipos de rGO sintetizados. Micrografías TEM y SEM de rGO1 a partir de grafito 1 suministrado por Merck (A, B). Micrografías TEM y SEM del lote de rGO2 sintetizado a partir de grafito 2 suministrado por Sigma-Aldrich (C y D).

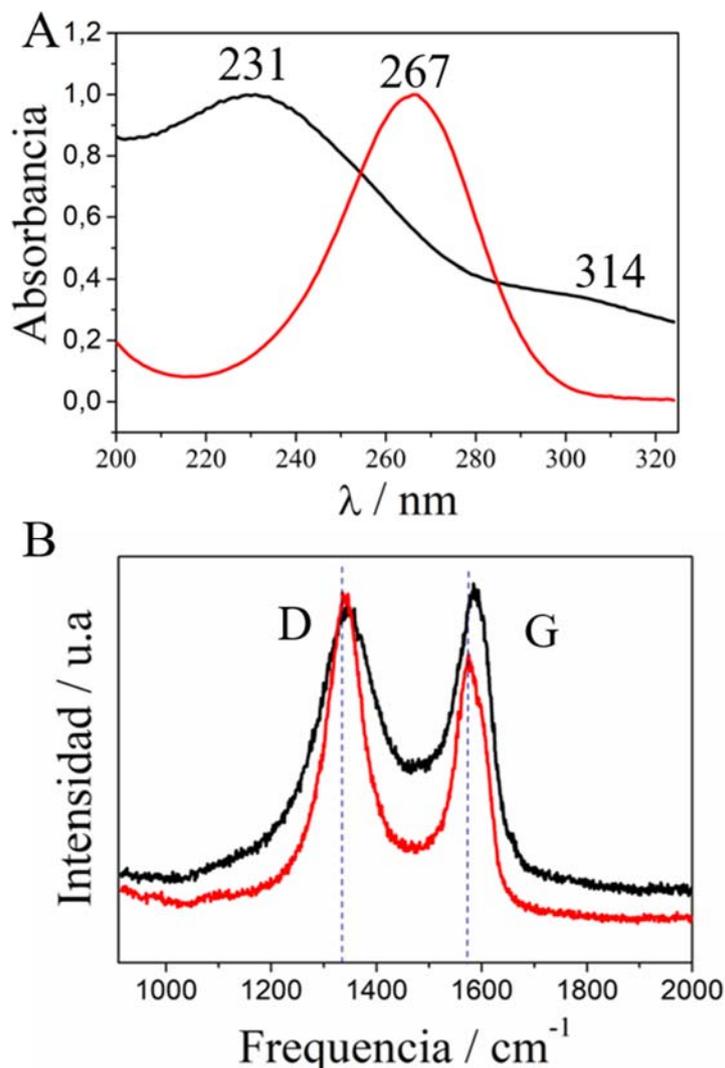
### 4.1.3 Caracterización espectroscópica de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido

La reacción de oxidación del grafito de partida a GO fue controlada mediante espectroscopia UV-Vis. El grafito en su forma inicial no presenta ninguna banda de absorción en el espectro UV-Vis, solamente es posible observar la dispersión de la luz provocada por las partículas de grafito. Mientras que el GO y rGO presentan unas bandas de absorción características en el espectro de UV-Vis que permite diferenciar ambas formas. Por tanto, mediante esta técnica espectroscópica es posible monitorizar el grado de exfoliación del GO y controlar el avance de la reducción de GO a rGO. En la Figura 4.4 (A) se muestra el espectro UV-Vis del GO<sub>2</sub> (color negro) y rGO<sub>2</sub> (color rojo) obtenidos a partir del grafito 2.

En el espectro UV-vis del GO<sub>2</sub> se puede observar una banda ancha centrada a 231 nm debida a las transiciones  $\pi-\pi^*$  de los enlaces C-C y otra banda situada a 314 nm debida a las transiciones de los grupos carbonilos introducidos (-C=O) durante el proceso de reducción química de GO a rGO con AA. En el espectro de rGO se observa que la banda atribuida a los grupos carbonilos (314 nm) desaparece y la banda de 231 nm se desplaza hasta llegar a 267 nm, debido al incremento de densidad electrónica en el plano basal del rGO.<sup>27,28</sup> Los cambios observados en el espectro de absorción han permitido monitorizar el proceso de reducción de GO a rGO en todas las síntesis efectuadas.

La espectroscopia Raman es una técnica de análisis muy útil en la caracterización de materiales basados en carbono. Esta técnica permite determinar la dispersión inelástica (Raman) de una molécula cuando es irradiada con un haz de luz monocromática. Mediante esta técnica es posible estudiar las propiedades estructurales de un material carbonáceo a través de cambios en la posición de los picos, su forma y su intensidad relativa.<sup>29</sup>

El grafito presenta dos bandas Raman características la banda D y la banda G. La banda D suele ser muy poco intensa y en ocasiones imperceptible. La banda G situada sobre los  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  presenta una mayor intensidad que la banda D, pero tampoco es perceptible.



**Figura 4.4** Seguimiento del proceso de síntesis de rGO2 a partir del grafito 2. Espectro UV-vis de una dispersión de GO2 (negro) y rGO2 (rojo) (A). Espectro Raman de GO2 (negro) y rGO2 (rojo) (B).

Por lo que el espectro Raman del material de partida, grafito, no presenta un espectro Raman con bandas definidas. En la Figura 4.4 (B) se puede observar el espectro Raman del GO2 y rGO2 obtenidos a partir de grafito 2. El espectro Raman de GO está compuesto por dos bandas bien diferenciadas. La banda D localizada sobre  $\sim 1330 \text{ cm}^{-1}$  y la banda G o gráfica situada sobre los  $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$ . Se puede observar cómo al oxidar el grafito a GO aumenta la intensidad de la banda D que ahora es detectable. Este aumento de la intensidad podría estar correlacionado con el grado de desorden del material carbonáceo y la formación de carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  durante el proceso de oxidación del grafito. Este cambio de hibridación del carbono hace perder la geometría planar propia de los carbonos con hibridación  $\text{sp}^2$ , dando lugar a una geometría tetraédrica que

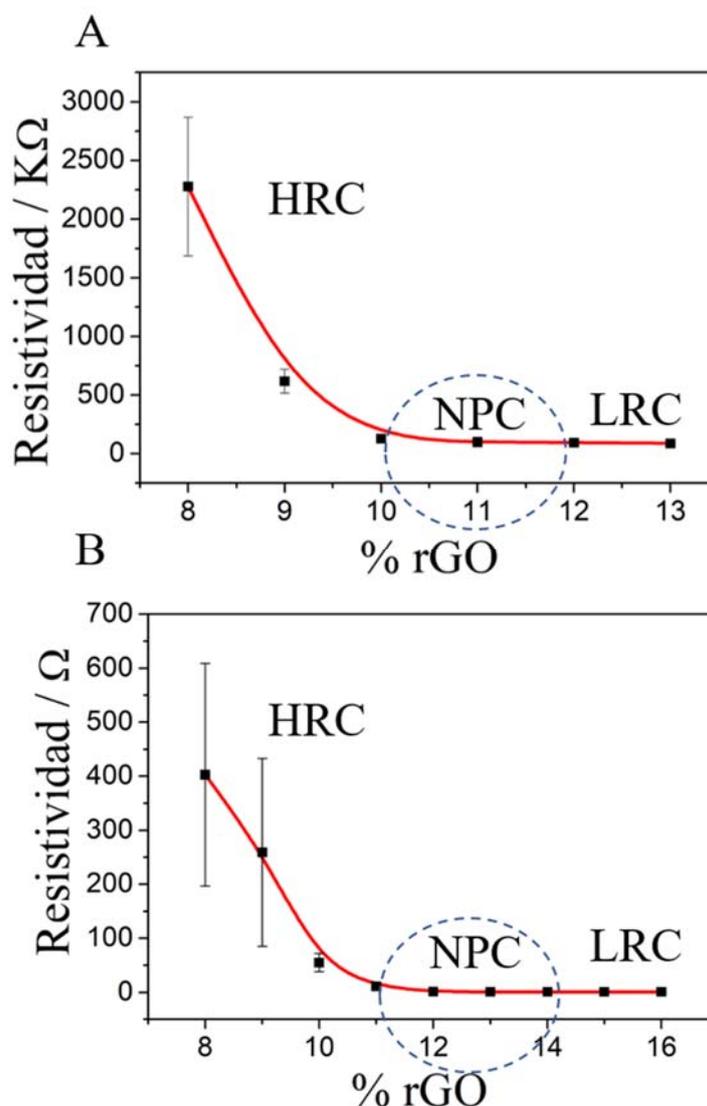
distorsiona la estructura de las láminas de GO obtenidas. El espectro Raman del rGO está formado también por dos picos intensos. La banda D del rGO situada a  $1340\text{ cm}^{-1}$  está ligeramente desplazada de la banda D del GO ( $1348\text{ cm}^{-1}$ ) observándose entre ambas una relación de intensidades prácticamente igual. La banda G del rGO está situada sobre  $1574\text{ cm}^{-1}$  por tanto, está desplazada hacia una frecuencia ligeramente menor respecto la banda G del GO ( $1585\text{ cm}^{-1}$ ), en este caso la relación entre intensidades es del 82%. Se ha de destacar que la relación entre la intensidad de las bandas D y G en el caso del GO es de 0,95 mientras que la relación de bandas D y G en el caso del rGO es de 1,23. Este aumento de la relación de las intensidades de las bandas D y G para el rGO después de la reducción, del GO a rGO en presencia de AA, puede ser atribuida a una disminución del dominio de los enlaces  $sp^2$  que están en un mayor número y en que el enlace C-C es más pequeño comparado con el GO.<sup>30,31</sup>

Analizando estos resultados se puede afirmar que, durante la oxidación del grafito de partida se introducen un gran número de grupos oxidados (-COOH, -OH, -CHO, -O- etc.) que aumentan el grado de desorden atómico en la estructura del grafito (banda D). Esto también confirma la presencia de dichos grupos y el aumento interlaminar, que permite exfoliar las diferentes láminas de óxido de grafito en GO. Finalmente, se obtiene rGO y se corrobora mediante la banda UV-Vis centrada a 267 nm y mediante el espectro Raman del rGO.

#### 4.1.4 Caracterización eléctrica de los transductores

Las propiedades eléctricas de los materiales compósitos conductores pueden explicarse a través de la teoría de la percolación.<sup>32</sup> La curva de percolación suministra información sobre la conductividad del compósito en función de la proporción del material conductor y material no conductor en la matriz polimérica. Este estudio permite optimizar, en una primera aproximación, la composición óptima del transductor que aportará las mejores propiedades electroanalíticas al sensor final. Con este objetivo se realizó una curva de percolación para cada uno de los dos rGO sintetizados. Las composiciones estudiadas en cada caso fueron 8-13 % para rGO1 y 8-16% para rGO2. Se construyeron dos baterías distintas de electrodos con ambos grafenos sintetizados, rGO1 y rGO2. En la Figura 4.5 se pueden observar las dos curvas de percolación obtenidas para las dos series de electrodos construidos. Se construyeron tres electrodos nanocompuestos para cada

composición, con el objetivo de evaluar la reproducibilidad del proceso de fabricación manual de éstos. En la Figura 4.5 (A) se puede observar que electrodos con un % de rGO1 inferior al 8% presentan valores de resistividad  $\sim \infty$ , y los electrodos con más de un 13% de rGO1 presentan una pobre estabilidad mecánica del nanocompósito.



**Figura 4.5** Curvas de percolación obtenidas para los dos grafenos sintetizados. (A) Curva de percolación obtenida utilizando rGO1 como material conductor en la fabricación de electrodos nanocompuestos. (B) Curva de percolación obtenida utilizando rGO2 como material conductor en la fabricación de electrodos nanocompuestos. En ambos gráficos se han identificado las tres zonas de respuesta: HRC, NPC y LRC.

Como puede verse en la Figura 4.5, la resistividad disminuye drásticamente de 400 KΩ hasta un mínimo de resistividad de aproximadamente 5 KΩ, donde las variaciones de resistividad son casi negligibles. En la gráfica 4.5 (A) se pueden observar tres zonas donde el comportamiento eléctrico de los electrodos varía: una zona de alta resistividad (*Higher*

*Resistivity Composition*, HRC) que está comprendida entre las composiciones de un 8 % y 10 % de rGO1. La zona cercana a la percolación (*Near Percolation Composition*, NPC) se encuentra comprendida entre las composiciones 10 % y 12 % de rGO1 y la zona de baja resistividad (*Low Resistivity Composition*, LRC) que está comprendida entre un 12 % y 13 % de material conductor en el nanocompuesto final. En la Figura 4.5 (A) también se puede observar como las desviaciones estándar de las diferentes resistividades promedio obtenidas es muy alta en la zona de HRC y disminuyen drásticamente a valores cercanos a 0 en la zona de NPC y de LRC. La falta de reproducibilidad en las medidas de resistencia en la zona HRC puede explicarse por la aleatoriedad espacial de las pocas partículas conductoras dentro de la fase polimérica.

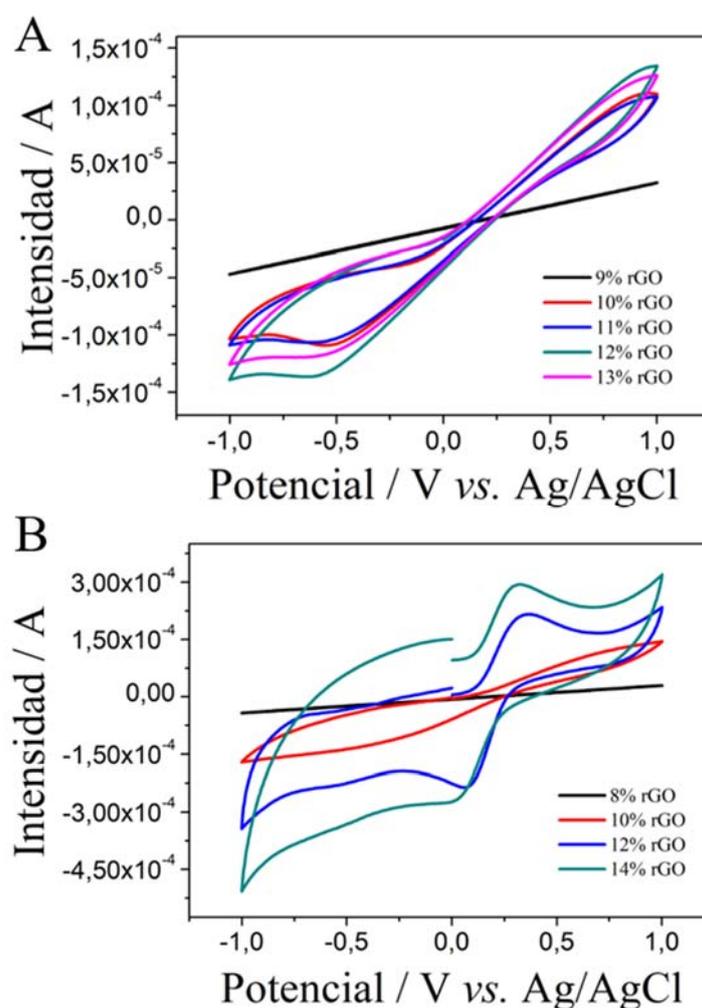
En la Figura 4.5 (B) se muestra la curva de percolación obtenida para los electrodos nanocompuestos utilizando como material conductor el segundo grafeno sintetizado, rGO2. En esta figura se puede observar que los electrodos que contienen menos de un 8% de rGO2 resultan aislantes ya que tienen una alta resistividad. En este caso la zona de composición cercana a la zona de percolación (NPC) se encuentra comprendida entre las composiciones 11 % y 14% de rGO2. Como se puede observar en la Figura 4.5 (B) las resistividades de los electrodos construidos con el rGO2 son significativamente más bajas que las de los electrodos construidos con rGO1. Los resultados obtenidos confirman que el rGO2 es más conductor que el rGO, por lo que a priori parece un material mucho más útil para ser utilizado en la construcción de sensores electroquímicos.

A pesar de estos resultados es necesaria una caracterización electroquímica complementaria de los electrodos nanocompuestos mediante CV e ESI que permita extraer información adicional de otros parámetros electroquímicos de interés como el área electroactiva, la resistencia a la transferencia de carga del material transductor y la reversibilidad del proceso electroquímico en la superficie del electrodo.

#### 4.1.5 Caracterización electroquímica mediante voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (*Cyclic Voltammetry*, CV) ha sido utilizada con el objeto de evaluar el efecto de la composición en la respuesta electroquímica de los electrodos nanocompuestos de rGO/epoxy fabricados. Se han caracterizado las dos series de electrodos construidos con rGO1 y rGO2. En la figura 4.6 se pueden observar los

voltamperogramas cíclicos obtenidos correspondientes a las dos series de electrodos. Las CV fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales, utilizando una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  en presencia del par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  de concentración  $0,01 \text{ M}$  y utilizando como fondo iónico una disolución  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{KCl}$ . Mediante esta técnica se pueden obtener diferentes parámetros electroquímicos como la intensidad de pico ( $I_p$ ), la diferencia de potencial entre los máximos de  $I_p^a$  y  $I_p^c$  ( $\Delta E$ ) y el área electroactiva (A). Estos parámetros obtenidos, para ambas series de electrodos, se muestran en la Tabla 4.1 y Tabla 4.2. Los electrodos construidos utilizando como material conductor el rGO1, presentan un comportamiento electroquímico distinto a los construidos con rGO2.



**Figura 4.6** Voltamperogramas cíclicos de los electrodos nanocompuestos construidos con los dos grafenos sintetizados: rGO1 (A) y rGO2 (B). Todos los experimentos se han realizado en un fondo iónico de  $\text{KCl}$   $0,1\text{M}$  conteniendo la pareja redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , la velocidad de barrido:  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En el caso de rGO1 no se obtuvieron unos voltamperogramas lo suficientemente definidos, como para poder extraer información útil (Figura 4.6 (A)). Solo se pueden apreciar bien definidos los picos de reducción, pero no los picos de oxidación.

En la Figura 4.6 (B) se puede observar que las composiciones con un contenido de 8 % y 10 % de rGO2, presentaban una baja conductividad la cual está asociada a la zona de alta resistividad o HRC de la curva de percolación. En estas composiciones el electrodo muestra una falta de conductividad y limitada transferencia de carga, por lo que no es posible la extracción de parámetros electroquímicos en este caso. A medida que se aumenta la carga de material conductor en el electrodo nanocompuesto, se observa un aumento de la intensidad de pico debido al aumento del área electroactiva del electrodo. Por otro lado, asociado al aumento del área electroactiva, también se observa una disminución de la separación de los potenciales de pico anódico y pico catódico, debido a un incremento en la transferencia de carga.

La forma de las CVs en el caso de rGO1 (Figura 4.6 (A)) se corresponde al comportamiento de un haz de microelectrodos que presenta una baja transferencia de carga, por lo que los picos no están definidos y, además, se encuentran separados. Únicamente se define bien el pico de reducción ( $I_p^c$ ), estando el potencial de reducción desplazado hacia un potencial más negativo (- 0,5 V) respecto al rGO2 (0,0 V). Mientras que el pico de oxidación ( $I_p^a$ ) solo está bien definido para el rGO2 a 0,25 V y en el caso del rGO1 no es definible. El comportamiento electroquímico de los electrodos fabricados con rGO1 está asociado con la poca conductividad y alta resistividad que presentan estos electrodos nanocompuestos, como se ha podido observar en el apartado 4.1.4 (Figura 4.5 (B)).

El área electroactiva fue calculada a partir de los valores de  $I_p$  de reducción ( $I_p^c$ ) obtenidos mediante la ecuación 4.1.<sup>33</sup>

$$I_p = 3,01 * 10^5 n^{\frac{3}{2}} (\alpha D_{red} v)^{\frac{3}{2}} A C_{red}^* \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Donde,  $\alpha$  corresponde al coeficiente de transferencia (0,5),  $D_{red}$  es el coeficiente de difusión de la especie reducida ( $6,32 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $v$  es la velocidad de barrido a la cual se ha llevado a cabo el experimento ( $0,01 \text{ Vs}^{-1}$ ),  $A$  el área electroactiva del electrodo y  $C_{red}^*$  es la concentración de la especie electroactiva en el seno de la disolución (0,01 M).

Por otro lado, también se ha calculado la intensidad de intercambio ( $i_0$ ) mediante los diagramas de Tafel. Este parámetro es de gran ayuda ya que permite calcular la  $R_{CT}$  mediante la ecuación 4.2.

$$i_0 = RT/nFR_{CT} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Se normalizó la resistencia a la transferencia de carga respecto al área electroactiva multiplicándola por ésta ( $R_{CT} \cdot A$ ). Como se puede observar en la Tabla 4.2 este parámetro presenta una tendencia a disminuir cuando incrementa la carga de material conductor en el nanocompuesto. Los cambios observados en  $R_{CT} \cdot A$  pueden ser atribuidos a la anisotropía que presentan estos materiales nanocompuestos.<sup>4,34,35</sup>

El área electroactiva de los electrodos fabricados con rGO1 es de 0,20 cm<sup>2</sup> para las composiciones de 10 % y 11 %, llegándose a un máximo de 0,26 cm<sup>2</sup> para el electrodo con una composición del 12 % y volviendo a disminuir para el electrodo del 13 % de rGO1 (Tabla 4.1). Debido a la respuesta de estos electrodos no ha sido posible calcular otros parámetros electroquímicos como  $i_0$ ,  $R_{CT}$ ,  $\Delta E$ ,  $R_{CT} \cdot A$ . Los resultados obtenidos corroboran los de la curva de percolación y evidencian las limitaciones de estos electrodos como transductores electroquímicos.

**Tabla 4.1** Parámetros extraídos de los voltamperogramas cíclicos de los transductores nanocompuestos construidos con rGO1. Donde  $I_p^c$ , es la intensidad de pico catódico, y A, es el área electroactiva.

% rGO1	$I_p^c$ (A)	A (cm <sup>2</sup> )
10	-1,09E-04	0,20
11	-1,06E-04	0,20
12	-1,37E-04	0,26
13	-1,19E-04	0,22

En relación con el segundo grafeno utilizado, rGO2, ha sido posible llevar a cabo una caracterización más exhaustiva. De los resultados obtenidos (Tabla 4.2) se puede observar que la intensidad de intercambio y la intensidad de pico anódico, incrementan al aumentar la carga de material conductor en el nanocompuesto.

Este comportamiento sólo se aprecia para las composiciones estudiadas mayores, 12 % y 14 % de rGO2. Mientras que para composiciones menores de 8 % y 10 %, la baja transferencia de carga no ha hecho posible el estudio.

**Tabla 4.2** Parámetros extraídos de los voltamperogramas cíclicos de los electrodos nanocompuestos contruidos con rGO2 de las diferentes composiciones estudiadas. Donde,  $i_0$  es la intensidad de corriente de intercambio;  $R_{ct}$  es la resistencia a la transferencia de carga;  $I_p^c$  es la intensidad de pico;  $A$  es el área electroactiva,  $\Delta E$  es la diferencia de potenciales de pico anódico y catódico y  $R_{ct} \cdot A$  es la resistencia a la transferencia de carga normalizada respecto el área electroactiva.

% rGO2	$i_0$ (A)	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )	$I_p^c$ (A)	$A$ ( $cm^2$ )	$\Delta E$ (V)	$R_{ct} \cdot A$ ( $\Omega cm^2$ )
8	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
12	9,23E-05	273,36	-2,16E-04	0,44	0,3027	120,28
14	1,40E-04	180,22	-,94E-04	0,51	0,3347	91,91

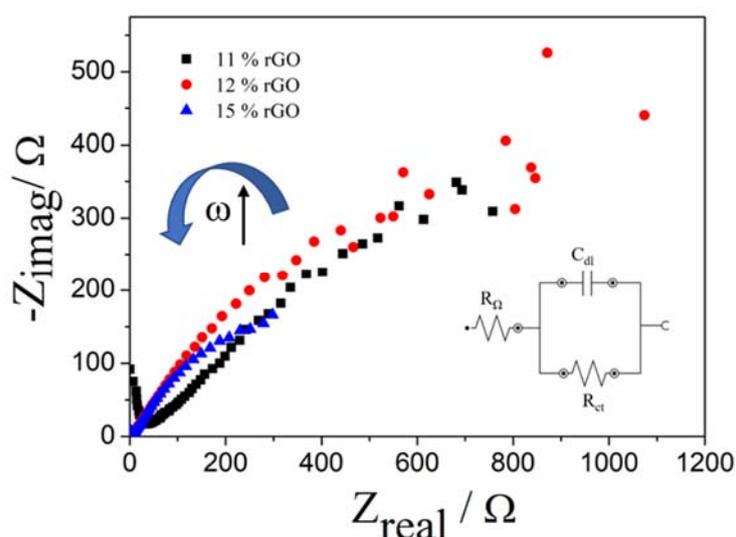
En este caso, la cantidad de rGO2 en el transductor es insuficiente para asegurar una transferencia electrónica mínima en el electrodo. Simultáneamente, la resistencia a la transferencia de carga normalizada por el área electroactiva disminuye cuando incrementa la carga de material conductor. Esta tendencia sólo se observa para las composiciones mayores de rGO2 (12 % y 14 %).

Por otro lado, se obtiene una mínima diferencia en la separación de los potenciales de pico al incrementar el porcentaje de rGO2, lo que evidencia que ambas composiciones (12 % y 14 %) tienen velocidades de transferencia de carga similares. Teniendo en cuenta todos estos parámetros se decidió abandonar la construcción de electrodos nanocompuestos utilizando el rGO1, ya que presentaba unas resistividades muy altas y unas propiedades electroquímicas insuficientes para su utilización posterior como sensores.

## 4.1.6 Espectroscopia electroquímica de impedancia

La técnica de espectroscopia electroquímica de impedancia (EIS) se ha utilizado para caracterizar electroquímicamente los materiales nanocompuestos basados en grafeno-epoxy desarrollados con rGO2. Se ha estudiado la respuesta electroquímica de estos materiales para composiciones correspondientes a la zona de NPC. Mediante la técnica de EIS se obtiene información electroquímica complementaria que permite determinar importantes características electroquímicas del material transductor. Los parámetros electroquímicos determinados son: la resistencia óhmica ( $R_{\Omega}$ ), que corresponde a la resistencia de la solución y la resistencia de contacto, la resistencia a la transferencia de carga ( $R_{CT}$ ) y la capacidad de la doble capa ( $C_{dl}$ ). Estos parámetros han sido obtenidos mediante el ajuste del diagrama de Nyquist obtenido, a un circuito eléctrico equivalente. El circuito de Randles:  $R_s \cdot (R_{CT} \cdot C_{dl})$ , es suficiente para interpretar los valores de  $R_{\Omega}$ ,  $R_{CT}$  y  $C_{dl}$ , desde el punto de vista de los fenómenos de interfase que ocurren en la celda electroquímica.

Los experimentos se han sido realizados en una disolución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  0,01 M en KCl 0,1 M. El intervalo de frecuencias utilizado para obtener el espectro de impedancia está comprendido entre 100 KHz y 100 mHz, usando el potencial de equilibrio redox ( $\approx 16$  mV) y una amplitud de señal de perturbación del sistema de 10 mV.



**Figura 4.7** Espectro electroquímico de impedancia de los electrodos nanocompuesto fabricados con diferentes composiciones de rGO. Las medidas fueron realizadas en KCl 0,1 M, como electrolito soporte, conteniendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  0,01 M. En el interior de la figura se encuentra el circuito equivalente utilizado (circuito de Randles).

En la figura 4.7 se muestran los resultados obtenidos mediante el correspondiente diagrama de Nyquist, donde se pueden observar los espectros de impedancia en función de la composición. No se evidencia con claridad ninguna de las zonas características de estos diagramas. Si bien se puede apreciar la mitad de un semicírculo más pronunciado cuánto mayor es la carga de material conductor, obteniéndose un semicírculo más pequeño y definido para la composición del 15%.

La caracterización de los transductores mediante EIS, da lugar a diagramas de Nyquist con mucho ruido, especialmente en la zona de frecuencias bajas. Este hecho parece estar relacionado con la propia naturaleza del material nanocompuesto. Como se puede apreciar de los diagramas de Nyquist obtenidos para las composiciones estudiadas de 11 %, 12 % y 15 %, los diagramas parecen mostrar que, en la reacción electroquímica en la superficie del electrodo, existe un dominio del control cinético por limitaciones en la transferencia de carga (zona del semicírculo). Frente a un efecto menor del control difusional, asociado con limitaciones en la transferencia de masa (zona lineal) (ver sección 1.8.1 del Capítulo 1).

En una primera aproximación, se intentó introducir la resistencia de Warburg en el circuito eléctrico equivalente de ajuste, pero al no disponer de un espectro lo suficientemente definido a frecuencias bajas no se pudo realizar este ajuste. Por este motivo se utilizó el circuito de Randles, ajustando un semicírculo a los puntos del diagrama correspondientes a frecuencias altas. Este comportamiento del nanomaterial es mucho más evidente para la mayor de las composiciones estudiadas (15 %), para la que se puede apreciar un diagrama de Nyquist con la mitad de un semicírculo más definido. Por lo tanto, la composición con más carga de material conductor tiene este semicírculo más pequeño, lo que está relacionado con una menor resistencia a la transferencia de carga.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de  $R_{\Omega}$ ,  $R_{CT}$ , y  $C_{dl}$ . Los valores de  $R_{\Omega}$ , muestran una tendencia decreciente a medida que incrementa la cantidad de rGO en el material transductor. Esta resistencia depende principalmente de la concentración iónica de la solución, de la naturaleza de los iones, del área electroactiva del electrodo y de la resistencia de contacto de los transductores. La  $R_{\Omega}$  depende principalmente de la resistencia del material compuesto cuando la carga de rGO es baja, mientras que a mayor cantidad de rGO la resistencia disminuye y es debida principalmente a la resistencia de la

solución. Desde el punto de vista electroquímico es necesario una  $R_{\Omega}$  baja, ya que este parámetro está relacionado con el tiempo de respuesta de nuestro transductor y a la sensibilidad.<sup>36</sup>

Los valores de  $R_{CT}$  se pueden ver en la tabla 4.1. Este parámetro es inversamente proporcional a la velocidad de transferencia de carga y también está relacionado con el tiempo de respuesta y la sensibilidad del transductor. Se puede observar una disminución de la  $R_{CT}$  a medida que se incrementa la carga de rGO en el transductor, lo que indica una fuerte relación entre la reactividad electroquímica y la composición del material conductor en la superficie del electrodo. Los electrodos con una carga mayor de rGO, presentan un área electroactiva mayor y, al mismo tiempo, incrementa la velocidad de transferencia electrónica. Con el objetivo de obtener una respuesta electroanalítica óptima se requieren valores de  $R_{CT}$  bajos.

**Tabla 4.3** Parámetros extraídos de los diagramas de impedancia, para diferentes composiciones de rGO, donde  $R_{\Omega}$  es la resistencia óhmica;  $R_{CT}$ , es la resistencia a la transferencia de carga y  $C_{dl}$  es la capacidad de doble capa.

<b>% rGO</b>	<b><math>R_{\Omega}</math> (<math>\Omega</math>)</b>	<b><math>R_{ct}</math> (<math>\Omega</math>)</b>	<b><math>C_{dl}</math> (F)</b>
<b>11</b>	176.000	204.000	7,79E-06
<b>12</b>	138	151.000	14.9
<b>15</b>	286	646	2.46

Cabe destacar que la normalización de la  $R_{CT}$  respecto al área electroactiva, calculada mediante CV, debería ser constante. Esto no sucede en estos electrodos, y puede ser atribuido al comportamiento anisotrópico que presentan los materiales de naturaleza carbonácea.

El tercer parámetro electroquímico, la  $C_{dl}$ , está relacionado con las características intrínsecas de la superficie del electrodo y, a su vez, su valor es directamente proporcional a la corriente de fondo o residual. A medida que se incrementa la carga de material conductor se observa un aumento de la corriente de fondo o residual que, en algunas ocasiones, puede llegar a enmascarar la señal faradaica del proceso de medida. Los electrodos basados en nanocompuestos solo muestran una pequeña fracción del material

en la superficie, por lo que hay múltiples zonas conductoras separadas por la fase aislante o matriz polimérica, lo que contribuye a observar un comportamiento de haces de microelectrodos, minimizando la corriente no faradaica. Esta disminución de la corriente no faradaica permite una mejora de la relación señal/ruido y, consecuentemente, una mejora en el límite de detección. Además, se ha de considerar que el aumento de rGO, aumenta la rugosidad y porosidad de la superficie de electrodo, incrementando el ruido de fondo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para otros electrodos compósitos desarrollados en el grupo de investigación, que utilizan como material conductor grafito o nanotubos de carbono.<sup>37,34</sup>

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por la técnica de espectroscopia electroquímica de impedancia, así como que las propiedades electroanalíticas óptimas de un electrodo son un tiempo de respuesta rápido, un límite de detección bajo y una alta sensibilidad, los nanocompuestos de composición del 15% de rGO presentan un equilibrio en todos estos requisitos y, por tanto, esta composición puede considerarse como óptima para el desarrollo de transductores amperométricos más eficaces. Asimismo, los nanocompuestos de proporciones de rGO cercanas a este valor, cabe esperar que presenten propiedades electroquímicas parecidas. De manera que pequeñas variaciones de la composición como, por ejemplo, las aleatorias asociadas con el sistema de fabricación manual utilizado o intencionadamente por modificaciones con (bio)catalizadores, no producirán variaciones importantes en las características de respuesta de los (bio)sensores optimizados, aumentando así la reproducibilidad del proceso de construcción de los dispositivos.

## 4.2 Caracterización electroanalítica mediante amperometría hidrodinámica

Una vez establecida el rango de proporciones óptimas de rGO<sub>2</sub> (entre un 12% y 14% de rGO<sub>2</sub>) en el nanocompuesto que aportan las mejores propiedades electroquímicas, se evaluó la respuesta electroanalítica de los electrodos construidos. Con el objetivo de completar el estudio y mejorar la respuesta de los transductores, se prepararon electrodos de composiciones extremas de la zona de percolación (NPC), inferior a 12% y superior a

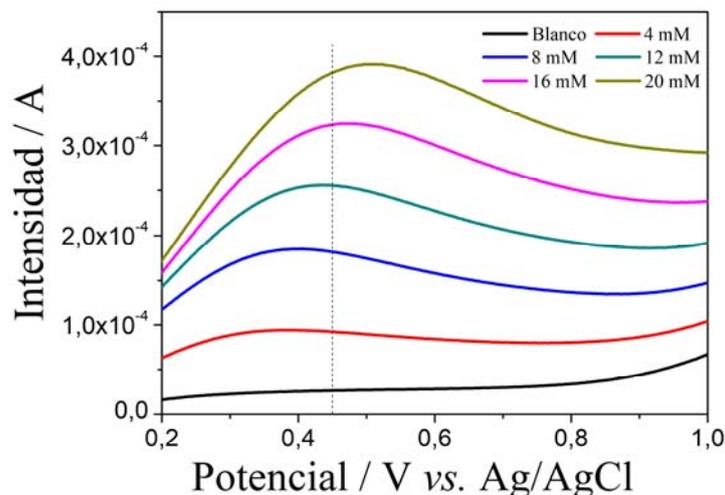
14%. El objeto era tanto mejorar el límite de detección (LD) (porcentajes < 12%) como la sensibilidad e intervalo de respuesta lineal del método (porcentajes > 14 %), por este motivo se construyeron electrodos con una composición del 11 % y 15 % de rGO<sub>2</sub>. Se procedió a utilizar la amperometría hidrodinámica utilizando como analito de referencia el ácido ascórbico. Este analito fue seleccionado porque puede estar presente en la mayoría de las muestras biológicas y puede interferir en la respuesta analítica de muchos de los sensores y biosensores que pueden desarrollarse con estos materiales.

### 4.2.1 Determinación del potencial de polarización

Previamente a estudiar las propiedades analíticas de los sensores desarrollados, se ha de determinar el potencial de polarización óptimo para la determinación del ácido ascórbico. De esta manera se ha realizado una voltamperometría de barrido lineal, a distintas concentraciones del analito de referencia, utilizando el sensor de 15 % de rGO<sub>2</sub>. Se escogió esta composición, porque la respuesta electroanalítica de sensores de composiciones incluidas en la zona de percolación (11 % - 14 %), es menor que para la máxima composición (15%) y, por tanto, esta composición asegura la máxima respuesta analítica.

En la Figura 4.8 se muestran los voltamperogramas lineales obtenidos para distintas concentraciones de ácido ascórbico. Se puede observar el aumento de la intensidad, la posterior platea y la estabilización de la intensidad a un valor máximo al incrementar el potencial aplicado. Se toma como potencial de polarización 450 mV (*vs.* Ag/AgCl), por ser este valor máximo de potencial asociado a la oxidación del analito cuando se trabaja en condiciones de control difusional.

A potenciales superiores se alcanza una estabilización de la intensidad registrada, porque la intensidad de corriente se hace independiente del potencial aplicado cuando el electrodo está totalmente polarizado. En este sentido el potencial de polarización obtenido es similar al de otros materiales carbonáceos como grafito y nanotubos de carbono, utilizados en el grupo de investigación para la fabricación de transductores compósitos.



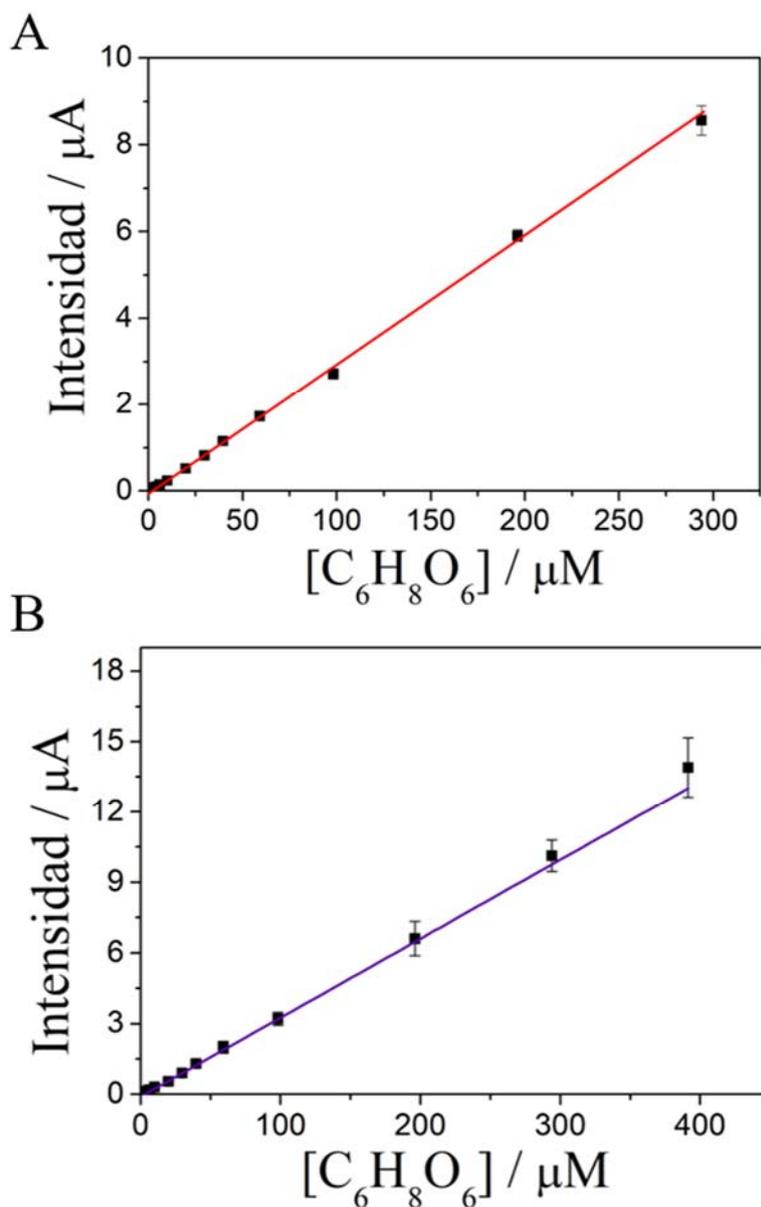
**Figura 4.8** Determinación del potencial de polarización utilizando el electrodo de rGO2 de 15%. Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de ácido ascórbico en una disolución de PBS 0,1M y KCl 0,1M. La frecuencia de escaneo utilizada es  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Calibrados de los sensores

Mediante amperometría hidrodinámica se determinaron los parámetros de calibración de dos sensores nanocompuestos de distinta composición de rGO2, con un 11 % y 15 % de material conductor. Las medidas fueron registradas a 450 mV vs. Ag/AgCl con agitación controlada (Figura 4.9).

Se escogieron estas composiciones para poder comparar la respuesta obtenida en la zona de percolación definida entre las composiciones de 11 % y 14 % y la zona de baja resistividad (14 % y 16 %). De esta manera se pueden comparar los diferentes parámetros analíticos obtenidos para ambas composiciones del transductor (NPC y LRC) y de esta manera definir las mejores propiedades analíticas. De los calibrados obtenidos se determinó el intervalo de respuesta lineal de concentración, la sensibilidad del sensor y el LD. El LD fue determinado experimentalmente como la mínima concentración de ácido ascórbico detectable bajo las condiciones de trabajo. Como se puede observar en la Tabla 4.4, el intervalo lineal de respuesta es ligeramente superior a medida que aumenta la carga de rGO2 en el transductor. De la misma manera el LD y la sensibilidad del sensor aumentan a medida que incrementa el porcentaje de material conductor en el transductor nanocompuesto. La sensibilidad de los electrodos aumenta con la carga de grafeno en su composición. Esto se debe al aumento de conductividad del material, generando intensidades más altas y pendientes de calibración mayores. Sin embargo, los

transductores con una carga inferior de grafeno en su composición presentan límites de detección más bajos. Esto se debe a que los valores de la capacidad de la doble capa son más pequeños en composiciones cercanas a la percolación, aumentando los valores de la relación señal/ruido. Estos resultados confirman que un sensor de composiciones pertenecientes a la zona de NPC, pese a tener una menor sensibilidad, presenta un mejor LD.



**Figura 4.9** Curvas de calibración obtenidas para dos sensores de rGO2 de distinta composición. Sensor con 11% rGO1 (A) y sensor con 15 % de rGO2 (B) en el transductor nanocompuesto.

Por otro lado, la estabilidad y la reproducibilidad observadas en la respuesta de los sensores de composiciones correspondientes a la zona de NPC es mejor que en la zona LRC, como se deduce de la mayor incertidumbre experimental (desviación estándar) observada para los sensores fabricados con transductores de mayor composición de rGO.

**Tabla 4.4** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para los sensores del 11 % y 15 % de rGO1, utilizando como analito ácido ascórbico. Medidas efectuadas en una disolución de PBS 0,1 M y con un potencial de trabajo 450 mV (n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del LD).

Sensor	rGO1 %	Intervalo lineal (μM)	Sensibilidad (μA·L·μM <sup>-1</sup> )	LD (μM)
NPC	11	1-294	0,0294 ± 0,0002	1,5 ± 0,7
LRC	15	1-391	0,035 ± 0,001	3,1 ± 0,3

### 4.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo han permitido extraer diferentes conclusiones:

- Se ha podido sintetizar rGO a partir de grafito comercial de diferentes características morfológicas. La síntesis de rGO se ha realizado utilizando dos tipos diferentes de grafito comercial, obteniéndose dos nanomateriales completamente distintos desde el punto de vista morfológico, estructural y electroquímico. Se ha podido escalar el método de síntesis establecido para obtener rGO en una escala multigramo. Este hecho es necesario para asegurar una cantidad suficiente de rGO para la construcción de transductores de las mismas características electroquímicas.
- La respuesta electroquímica de los transductores nanocompuestos basados en óxido de grafeno reducido, rGO, obtenido de distintos materiales de partida, muestra una gran diferencia en lo que al material conductor final se refiere. El rGO2 presenta unas propiedades electroquímicas mejores, respecto al rGO1. Este hecho se podría atribuirse a la morfología que presenta el grafito de partida previamente a la síntesis de Hummers. Ya que el método de síntesis ha sido el

mismo en ambos casos, se puede concluir que el grafito con una estructura laminar proporciona unas cantidades de rGO apropiadas para el desarrollo de sensores transductores electroquímicos. La morfología y estructura del grafito de partida que utilicemos definirá las propiedades electrónicas del rGO que se obtenga

- La respuesta electroquímica de las dos series de transductores construidos con los diferentes rGOs obtenidos, presenta diferencias significativas en lo que al material conductor respecta. Dado que el rGO1 dio lugar a transductores con una alta resistividad eléctrica, y teniendo en cuenta las CV obtenidas, se descartó el uso de este nanomaterial obtenido a partir del grafito 1, para la construcción de transductores electroquímicos.
- Finalmente, se ha evaluado la respuesta analítica de los sensores, utilizando la amperometría hidrodinámica como técnica analítica. Los resultados obtenidos corroboraron la utilidad del rGO para el desarrollo de transductores electroquímicos y sensores. Los sensores de composición del 15% de rGO2 presentan la suficiente sensibilidad y LD para posibles futuras aplicaciones en el desarrollo de (bio)sensores para la detección de analitos de interés.

## 4.4 Bibliografía

- (1) Montes, R.; Bartrolí, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Towards to the Improvement of the Analytical Response in Voltammetric Sensors Based on Rigid Composites. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *733*, 69–76.
- (2) Muñoz, J.; Brennan, L. J.; Céspedes, F.; Gun'ko, Y. K.; Baeza, M. Characterization Protocol to Improve the Electroanalytical Response of Graphene-Polymer Nanocomposite Sensors. *Compos. Sci. Technol.* **2016**, *125*, 71–79.
- (3) Montes, R.; Baeza, M.; Muñoz, J. 0D Polymer Nanocomposite Carbon-Paste Electrodes Using Carbon Nanohorns: Percolating Networks, Electrochemical Achievements and Filler Comparison. *Compos. Sci. Technol.* **2020**, *197* (May), 0–4.

- (4) Montes, R.; Céspedes, F.; Baeza, M. Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor for IgG Detection Based on Optimized Rigid Biocomposites. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 505–512.
- (5) Muñoz, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Modified Multiwalled Carbon Nanotube/Epoxy Amperometric Nanocomposite Sensors with CuO Nanoparticles for Electrocatalytic Detection of Free Chlorine. *Microchem. J.* **2015**, *122*, 189–196.
- (6) Montes, R.; Sánchez, G.; Zhao, J.; Palet, C.; Baeza, M.; Bastos-Arrieta, J. Customized in Situ Functionalization of Nanodiamonds with Nanoparticles for Composite Carbon-Paste Electrodes. *Nanomaterials* **2020**, *10* (6), 1–15.
- (7) Muñoz, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Effect of Carbon Nanotubes Purification on Electroanalytical Response of Near-Percolation Amperometric Nanocomposite Sensors. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, *162* (8), B217–B224.
- (8) Montes, R.; Bartrolí, J.; Baeza, M.; Céspedes, F. Improvement of the Detection Limit for Biosensors: Advances on the Optimization of Biocomposite Composition. *Microchem. J.* **2015**, *119*, 66–74.
- (9) Muñoz, J.; Montes, R.; Bastos-Arrieta, J.; Guardingo, M.; Busqué, F.; Ruíz-Molina, D.; Palet, C.; García-Orellana, J.; Baeza, M. Carbon Nanotube-Based Nanocomposite Sensor Tuned with a Catechol as Novel Electrochemical Recognition Platform of Uranyl Ion in Aqueous Samples. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *273* (June), 1807–1815.
- (10) Muñoz, J.; Bartrolí, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Influence of Raw Carbon Nanotubes Diameter for the Optimization of the Load Composition Ratio in Epoxy Amperometric Composite Sensors. *J. Mater. Sci.* **2014**, *50* (2), 652–661.
- (11) Muñoz, J.; Baeza, M. Customized Bio-Functionalization of Nanocomposite Carbon Paste Electrodes for Electrochemical Sensing: A Mini Review. *Electroanalysis* **2017**, *29* (7), 1660–1669.
- (12) Muñoz, J.; Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, M.; Muraviev, D.; Céspedes, F.; Baeza, M. CdS Quantum Dots as a Scattering Nanomaterial of Carbon Nanotubes in Polymeric Nanocomposite Sensors for Microelectrode Array Behavior. *J. Mater.*

- Sci.* **2016**, *51* (3), 1610–1619.
- (13) K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. G. and A. A. F. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **2016**, *306* (5696), 666–669.
- (14) Muñoz. J, Bastos-Arrieta. J, Baeza. M. Carbon/Polymer Nanocomposite (Bio)Sensing Containng Nanoparticles : Funcionalization And Aplications. Chapter of Book.
- (15) Suvarnaphaet, P.; Pechprasarn, S. Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors (Switzerland)* **2017**, *17* (10).
- (16) Allen, M. J.; Tung, V. C.; Kaner, R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (1), 132–145.
- (17) Atif, R.; Shyha, I.; Inam, F. Mechanical, Thermal, and Electrical Properties of Graphene-Epoxy Nanocomposites-A Review. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (8).
- (18) Xu, C.; Wang, X.; Zhu, J. Graphene - Metal Particle Nanocomposites. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (50), 19841–19845.
- (19) Artiles, M. S.; Rout, C. S.; Fisher, T. S. Graphene-Based Hybrid Materials and Devices for Biosensing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (14–15), 1352–1360.
- (20) Martín, A.; Escarpa, A. Graphene: The Cutting-Edge Interaction between Chemistry and Electrochemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *56*, 13–26.
- (21) Liu, Y.; Dong, X.; Chen, P. Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2283–2307.
- (22) Shin, H. J.; Kim, K. K.; Benayad, A.; Yoon, S. M.; Park, H. K.; Jung, I. S.; Jin, M. H.; Jeong, H. K.; Kim, J. M.; Choi, J. Y.; Lee, Y. H. Efficient Reduction of Graphite Oxide by Sodium Borohydride and Its Effect on Electrical Conductance. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (12), 1987–1992.
- (23) Fan, Y.; Liu, J. H.; Yang, C. P.; Yu, M.; Liu, P. Graphene-Polyaniline Composite Film Modified Electrode for Voltammetric Determination of 4-Aminophenol. *Sensors Actuators, B Chem.* **2011**, *157* (2), 669–674.

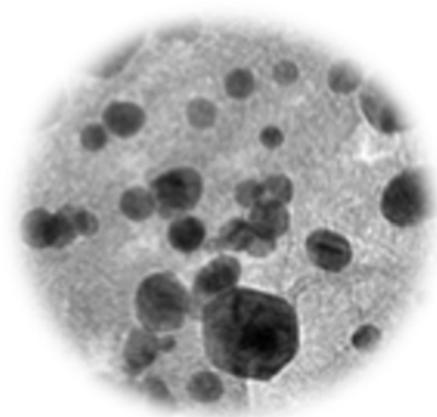
- (24) Stobinski, L.; Lesiak, B.; Malolepszy, A.; Mazurkiewicz, M.; Mierzwa, B.; Zemek, J.; Jiricek, P.; Bieloshapka, I. Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Studied by the XRD, TEM and Electron Spectroscopy Methods. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* **2014**, *195*, 145–154.
- (25) Compton, O. C.; Nguyen, S. T. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* **2010**, *6* (6), 711–723.
- (26) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339.
- (27) Fernández-Merino, M. J.; Guardia, L.; Paredes, J. I.; Villar-Rodil, S.; Solís-Fernández, P.; Martínez-Alonso, A.; Tascón, J. M. D. Vitamin C Is an Ideal Substitute for Hydrazine in the Reduction of Graphene Oxide Suspensions. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (14), 6426–6432.
- (28) Li, D.; Müller, M. B.; Gilje, S.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G. Processable Aqueous Dispersions of Graphene Nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3* (2), 101–105.
- (29) Yang, H.; Hu, H.; Ni, Z.; Poh, C. K.; Cong, C.; Lin, J.; Yu, T. Comparison of Surface-Enhanced Raman Scattering on Graphene Oxide, Reduced Graphene Oxide and Graphene Surfaces. *Carbon N. Y.* **2013**, *62*, 422–429.
- (30) TUINSTRA F; KOENIG JL. Raman Spectrum of Graphite. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53* (3), 1126–1130.
- (31) Stankovich, S.; Dikin, D. A.; Piner, R. D.; Kohlhaas, K. A.; Kleinhammes, A.; Jia, Y.; Wu, Y.; Nguyen, S. B. T.; Ruoff, R. S. Synthesis of Graphene-Based Nanosheets via Chemical Reduction of Exfoliated Graphite Oxide. *Carbon N. Y.* **2007**, *45* (7), 1558–1565.
- (32) Scher, H.; Zallen, R. Critical Density in Percolation Processes. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53* (9), 3759–3761.
- (33) Laoire, C. O.; Mukerjee, S.; Abraham, K. M.; Plichta, E. J.; Hendrickson, M. A. Elucidating the Mechanism of Oxygen Reduction for Lithium-Air Battery Applications. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (46), 20127–20134.

- (34) Muñoz, J. Advanced Amperometric Nanocomposite Sensors Based on Carbon Nanotubes and Graphene : Characterization , Optimization , Functionalization and Applications. **2015**, Tesis Doctoral.
- (35) Muñoz, J.; Riba-Moliner, M.; Brennan, L. J.; Gun'ko, Y. K.; Céspedes, F.; González-Campo, A.; Baeza, M. Amperometric Thyroxine Sensor Using a Nanocomposite Based on Graphene Modified with Gold Nanoparticles Carrying a Thiolated  $\beta$ -Cyclodextrin. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (5), 1579–1589.
- (36) Muñoz, J.; Montes, R.; Baeza, M. Trends in Electrochemical Impedance Spectroscopy Involving Nanocomposite Transducers: Characterization, Architecture Surface and Bio-Sensing. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2017**, *97*, 201– 215.
- (37) Montes, R. Caracterización de (bio)compósitos en función de la proporción de grafito y optimización de la composición para su aplicación en (bio)sensores amperométricos. **2014**, Tesis Doctoral.

# Capítulo 5

Síntesis de nanopartículas metálicas y materiales híbridos para el desarrollo de transductores basados en nanocompuestos de óxido de grafeno reducido

---





## CAPÍTULO 5

### **Síntesis de materiales híbridos para el desarrollo de transductores basados en nanocompuestos de óxido de grafeno**

La nanotecnología se ha convertido en los últimos años en uno de los campos más excitantes en la química analítica.<sup>1</sup> Hoy en día existen una gran variedad de nanomateriales, especialmente nanopartículas (NPs) con diferentes propiedades enfocadas a diferentes aplicaciones dentro de la química analítica.<sup>2,3</sup> Debido a su pequeño tamaño, las NPs poseen propiedades químicas, físicas y electrónicas que las diferencian del material en estado *bulk*. Existen un gran número de NPs, con diferentes formas, tamaños y elementos que determinan las propiedades de las mismas NPs.<sup>4,5</sup> En electroquímica las NPs pueden tener diferentes funciones cuando se aplican en sensores enzimáticos, inmunosensores etc. Generalmente, las NPs metálicas poseen excelente conductividad eléctrica, por lo que son utilizadas como “cables electrónicos” aumentando la transferencia electrónica entre los puntos electroactivos de un transductor.<sup>6-8</sup> Las NPs pueden desempeñar diferentes funciones en el desarrollo de sensores electroquímicos, como son la inmovilización de biomoléculas en la superficie de la NP, la catálisis de reacciones electroquímicas o el aumento de la transferencia electrónica entre otras.<sup>2,9-11</sup>

Desde el aislamiento de una sola lámina de grafeno por Konstantine Novoselov y Andre Geim,<sup>12</sup> el desarrollo de transductores y biosensores basados en rGO, y la aplicación de este nanomaterial, ha aumentado significativamente.<sup>13</sup> Esto es debido a las propiedades electrónicas únicas que este material presenta respecto a otros materiales carbonáceos como el grafito, nanotubos de carbono, entre otros.<sup>14-16</sup> Las propiedades electroquímicas del rGO otorgan a este material unas cualidades óptimas para el desarrollo de biosensores electroquímicos.

Los sensores electroquímicos requieren frecuentemente del uso de modificadores químicos con el objetivo de mejorar la sensibilidad y selectividad frente a un analito de interés. Estas modificaciones suelen incorporar moléculas en la superficie del rGO que aumentan la capacidad hidrofílica del material transductor, que provoca un efecto preconcentrador del analito en la superficie del electrodo, dando lugar a un aumento de la intensidad de corriente.<sup>6,8,11,17-19</sup> Por otro lado, la modificación de los transductores con moléculas biocatalíticas como las enzimas, permite aumentar la selectividad de los sensores. El reconocimiento específico entre un determinado analito y los centros activos de la enzima correspondiente, hace que el analito sea reconocido de forma selectiva, dando lugar a una reacción biocatalítica que genera una especie electroactiva.

Con el objetivo de mejorar las propiedades electroquímicas de los transductores desarrollados en este trabajo, se procedió a la funcionalización del material conductor (rGO) con nanopartículas metálicas (NPs). Las pequeñas dimensiones de las NPs, confieren a los materiales que las incorporan un efecto catalítico en la transducción electroquímica, permitiendo además la funcionalización posterior del material conductor con moléculas biológicas y aumentando la selectividad de los dispositivos desarrollados. Además, debido al pequeño tamaño que éstas tienen, la composición óptima del material nanocompuesto transductor no se ve significativamente alterada.

Una dispersión de NPs esféricas de Au, presenta un espectro de extinción con un máximo de absorbancia centrado en 520 nm.<sup>20</sup> Esto es debido a la oscilación coherente de los electrones más polarizables del metal, cuando son irradiados con una fuente UV-Vis. Otra característica que se debe tener en cuenta es la relación entre el volumen y la superficie, la cual es mayor cuanto más pequeña es la NP. Esto confiere a la NP una gran área superficial, con lo que se obtiene un material conductor con muchos más puntos reactivos.<sup>4,5,21</sup> En este aspecto la funcionalización de rGO con NPs metálicas, ofrece la posibilidad de obtener un nanomaterial híbrido con características totalmente diferentes. Es conocido que el Au, Pd, Ag y otros metales, catalizan la oxidación del peróxido de hidrógeno, por lo que en este trabajo se ha funcionalizado rGO con NPs de Au, Pd, y Ag con el objetivo de construir electrodos nanocompuestos, utilizando como material conductor rGO funcionalizado y evaluar las propiedades electroquímicas que se derivan.

Con el objetivo de obtener un nanomaterial híbrido se han aplicado dos estrategias distintas complementarias. Por un lado, se han incorporado NPs en la matriz del

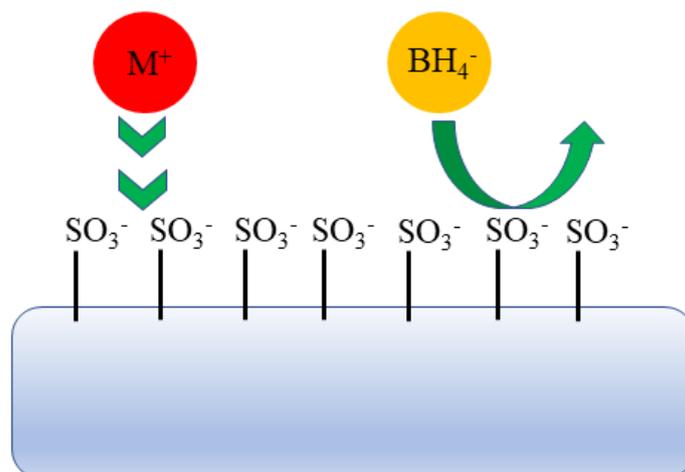
nanocompósito y, por otro, se ha funcionalizado el material conductor (NPs@rGO) antes de la preparación del nanocompósito. La primera estrategia consiste en utilizar la técnica intermatricial. Esta técnica se basa en el uso de una resina catiónica que actúa como molde para albergar las NPs sintetizadas. Posteriormente, esta resina es calcinada, obteniéndose un residuo sólido correspondiente a las NPs. Frecuentemente, este método proporciona una buena distribución de NPs en la matriz soporte. La segunda estrategia implementada en esta tesis doctoral es la reducción del GO y su funcionalización simultánea con NPs metálicas. Este procedimiento permite la obtención de rGO funcionalizado con NPs metálicas con una buena distribución de las NPs en éste.

## 5.1 Síntesis intermatricial de nanopartículas metálicas

La síntesis intermatricial es una metodología *in-situ* para la preparación de nanomateriales híbridos. La principal ventaja de esta técnica es que, con frecuencia, se obtiene una distribución homogénea del tamaño de las NPs en la matriz soporte. Este hecho es de gran importancia para maximizar las propiedades para las diversas aplicaciones. Es importante destacar que, con el objetivo de maximizar el efecto catalítico del nanomaterial es crucial obtener una distribución de NPs lo más homogénea posible en cuanto a tamaño, en la superficie del polímero, con el objeto de proporcionar el máximo número de centros catalíticos.<sup>22-25</sup>

En aplicaciones electroquímicas una buena distribución de NPs en el nanocompósito proporcionará una conductividad electrónica idónea en la superficie del electrodo y, por consiguiente, una buena transferencia electrónica en el transductor.

La distribución de NPs en el polímero está relacionada con el tipo de agente reductor que se utiliza durante la reducción química. El efecto de exclusión de Donnan (Figura 5.1) sirve para explicar la distribución final de NPs en el polímero. Este fenómeno se basa en la imposibilidad que tienen los iones de difundir hacia una fase heterogénea. Esto sucede cuando las cargas electrostáticas de las especies son iguales a la de los grupos funcionales de intercambio iónico.<sup>25</sup>



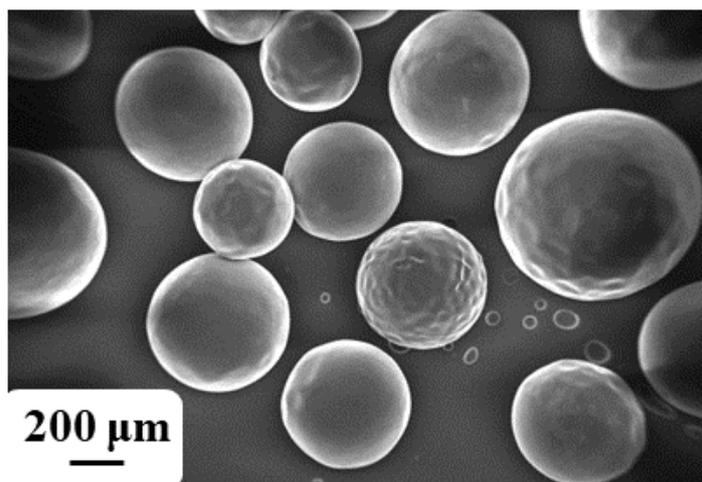
**Figura 5.1** Representación esquemática del efecto de exclusión de Donnan durante el intercambio de iones. Repulsión de iones de misma carga electrostática.

Esto impide que los iones difundan al interior del polímero, por lo que se obtiene una distribución de NPs mayor cerca de la superficie del polímero. Por contrapartida, si se utiliza un agente reductor con carga neutra probablemente se obtiene una distribución de NPs en el interior y exterior de la matriz polimérica soporte.

Como se ha comentado en la sección 3.3, para la síntesis de NPs de Au y Ag se utilizó una resina de intercambio catiónico que contiene grupos sulfónicos ( $\text{R-SO}_3$ ) en la superficie del polímero. Las NPs obtenidas fueron extraídas del polímero por calcinación de éste, e integradas posteriormente en la matriz del nanocompuesto durante el proceso de preparación del material compuesto, antes del proceso de endurecimiento.

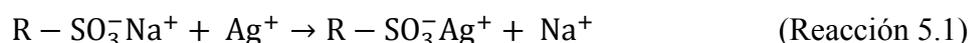
### 5.1.1 Síntesis intermatricial de nanopartículas de Ag utilizando un polímero de intercambio catiónico

Con el objetivo de obtener NPs de Ag se procedió a utilizar la resina de intercambio catiónico, Purolite C100-E (Figura 5.2). Esta resina está funcionalizada con grupos  $\text{R-SO}_3^-$  como grupos de intercambio catiónico y tiene una capacidad de intercambio iónico de 2,1 meq/g.

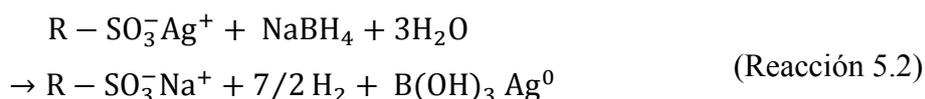


**Figura 5.2** Micrografía SEM de la resina de intercambio catiónico C100-E.

El proceso de síntesis intermatricial se lleva a cabo en dos etapas detalladas a continuación. En una primera etapa se introduce en la resina la sal precursora del metal del cuál se desea obtener las nanopartículas. En este caso se utilizó una sal de  $\text{AgNO}_3$  (Reacción 5.1):

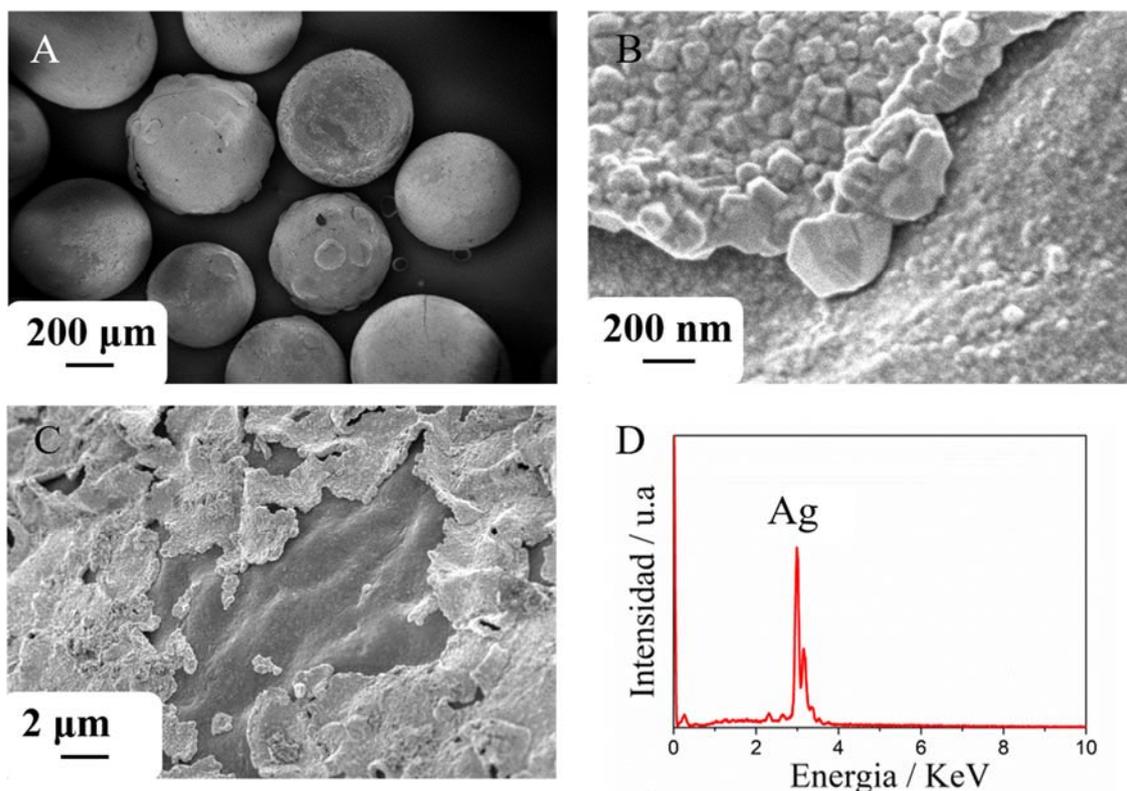


Una vez se han cargado los grupos sulfónicos con el ion metálico, se procede a la reducción química utilizando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor (Reacción 5.2):

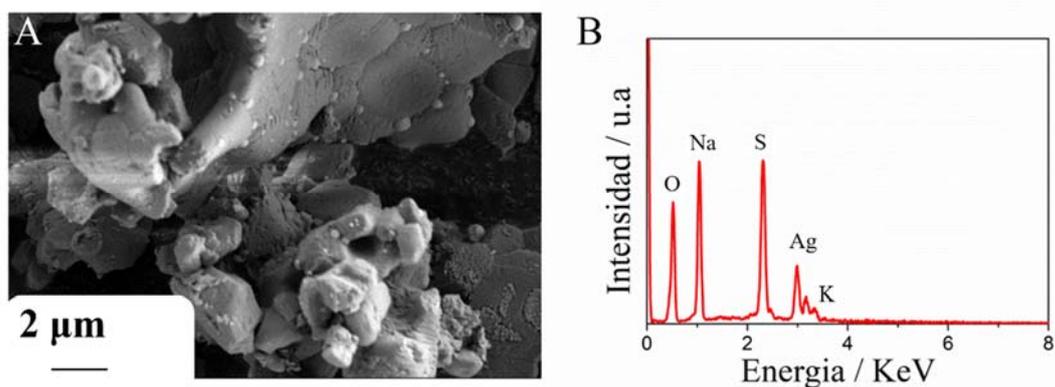


En la Figura 5.3 (A) se muestran las perlas de resina C100-E con NPs de Ag en la superficie del polímero. Se observa una superficie más rugosa como se puede ver también en la figura 5.3 (B y C). Cabe destacar que no se logró obtener una distribución de tamaño homogénea de las NPs metálicas generadas. Las NPs formadas presentan un tamaño irregular, con un tamaño medio ( $\sim 150 \text{ nm}$ ) muy superior al deseado, un orden de magnitud inferior, debido a la aglomeración de NPs que se produce. El diagrama EDX (Figura 5.3 D) permitió confirmar la presencia de Ag. Como el objetivo final de la síntesis era obtener una dispersión de NPs de Ag de un tamaño homogéneo en forma de polvo, se procedió a calcinar el polímero para poder obtener residuo sólido correspondiente a NPs

de Ag. El proceso térmico se llevó a cabo a 450 ° C, y se obtuvo el producto resultante que se muestra en la figura 5.4 (A).



**Figura 5.3** Micrografías TEM de la resina C100-E funcionalizada con AgNPs, a distinta escala 200  $\mu\text{m}$  (A), 200 nm (B) y 2  $\mu\text{m}$  (C), (D) Espectro EDX de las NPs de Ag sintetizadas



**Figura 5.4** Caracterización de la resina calcinada. Micrografía de la resina C100-E calcinada (A). Espectro EDX (B).

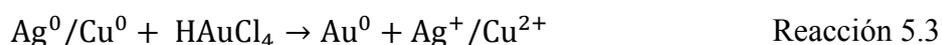
Como se puede observar en la Figura 5.4 (A) la calcinación no llegó a ser completa, dejando abundantes residuos orgánicos. En la Figura 5.4 (B) se puede observar el espectro EDX de la resina calcinada. En él se observan elementos como el azufre, debido a una

incompleta calcinación de la resina y un alto contenido en carbono. Dada la imposibilidad de obtener NPs de un tamaño adecuado y la aglomeración de NPs, junto con la ineficacia del proceso de calcinación, se consideró no continuar con la síntesis de NPs de Ag para el desarrollo y construcción de (bio)sensores electroquímicos por esta vía.

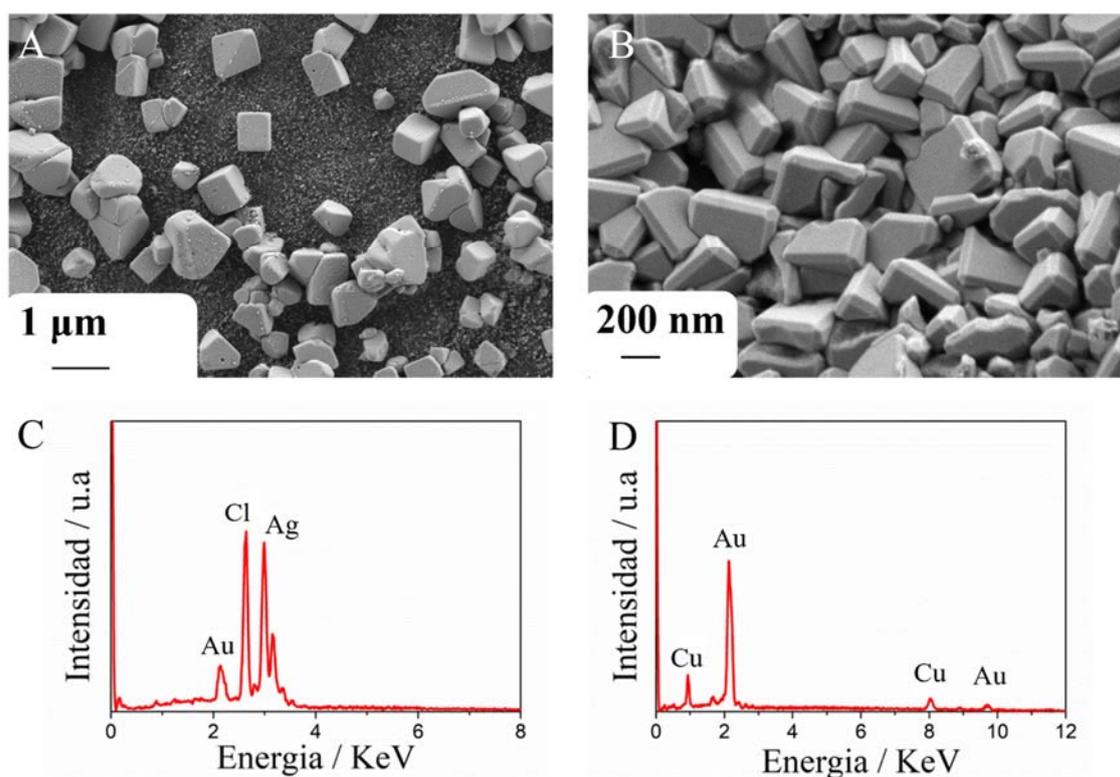
### 5.1.2 Síntesis intermatricial de nanopartículas de Au utilizando un polímero de intercambio catiónico

Se estudió la síntesis de NPs de Au, debido a la importancia que tiene este metal como catalizador en la reacción de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El peróxido de hidrógeno es un producto de la catálisis enzimática de un amplio grupo de enzimas llamadas oxidasas. La oxidación posterior del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en el proceso enzimático, sobre la superficie del electrodo, permite la detección de muchos analitos biológicos que no pueden ser determinados directamente por no ser moléculas electroactivas. Por este motivo se procedió a la síntesis de NPs de Au, con el objetivo de obtener un catalizador que pudiera ser incorporado en los (bio)sensores a desarrollar. En la figura 5.5 (A, B) se pueden observar las NPs de Au obtenidas con dos estrategias diferentes. Estas NPs se presentan como polígonos irregulares de un tamaño aproximado de 200 nm en su sección más larga.

En este caso se utilizó la sal HAuCl<sub>4</sub> como fuente de Au. Pero, no se pudo realizar la misma estrategia que la utilizada para la síntesis de NPs de Ag debido al anión AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> utilizado como fuente de Au. Como se ha comentado antes la resina catiónica está funcionalizada con grupos sulfónicos que tienen una carga electrostática negativa. De manera que se procedió a realizar un desplazamiento galvánico utilizando dos metales distintos como metal de sacrificio, Ag y Cu. El desplazamiento galvánico se basa en añadir un paso previo a la síntesis de las NPs metálicas que consiste en posicionar un metal, con un potencial de reducción adecuado (menor al potencial de reducción del Au), en la superficie de la resina. El objetivo es que se dé la reacción de reducción del catión metálico de interés, proveniente de la sal de partida (Reacción 5.3), y la oxidación del metal de sacrificio (Ag o Cu).



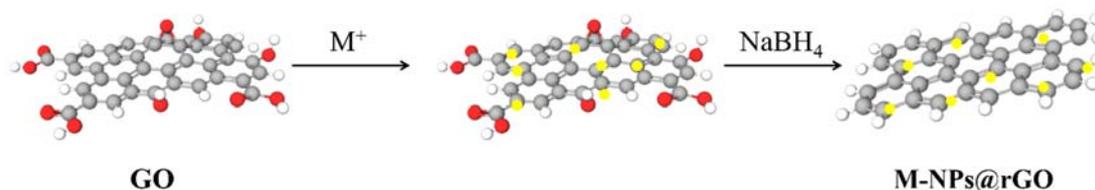
Teniendo en cuenta las potenciales redox del Au ( $E_{Au^{3+}/Au} = 1,31V$ ) y los de la Ag y el Cu ( $E_{Ag^+/Ag} = 0,80V$ ,  $E_{Cu^{2+}/Cu} = 0,34V$ ), se utilizaron estos metales en dos síntesis diferentes, evaluando el desplazamiento galvánico entre Au/Ag y Au/Cu. Como se puede observar en la Figura 5.5 ambas metodologías dieron lugar a NPs de Au en forma de polígonos irregulares, pero si se observa el espectro EDX de las NPs obtenidas (Figura 5.5 (C y D)), se evidencia la presencia de Ag y Cu en las NPs de Au obtenidas. Este experimento confirma que permanece Ag o Cu en la resina, después del proceso de intercambio galvánico, por lo que este se puede considerar incompleto. Por esta razón, se decidió abandonar esta estrategia de síntesis y se optó como alternativa, la vía de la funcionalización previa del material conductor.



**Figura 5.5** Micrografías TEM de la resina C100-E funcionalizada con Au/NPs con los desplazamientos galvánicos estudiados: Au/Ag (A) y Au/Cu. Espectros EDX correspondientes al desplazamiento de Au/Ag (C) y Au/Cu (D).

## 5.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas metálicas

El objetivo de esta parte de la tesis es obtener un nanomaterial híbrido que combine las propiedades electrónicas y electroquímicas del rGO con las propiedades catalíticas que tienen las NPs metálicas. En este sentido se procedió a la funcionalización y reducción *in-situ* de GO con NPs metálicas de diversos metales, obteniéndose un nuevo nanomaterial híbrido alternativo. En la figura 5.6 se muestra un esquema de la estrategia sintética implementada. Esta estrategia consiste en funcionalizar el GO con la sal precursora del metal y, posteriormente, proceder a reducir simultáneamente la sal y el GO, para obtener rGO funcionalizado con NPs metálicas. Se ha de destacar que, en todos los estudios realizados a partir de este punto se ha utilizado el grafito suministrado por Sigma Aldrich (Grafito2, GO2, rGO2) porque, como se ha concluido en el capítulo anterior, es el que presenta las mejores características electroquímicas. Para simplificar, a partir de este punto se utilizará la nomenclatura sin numeración (GO, rGO).



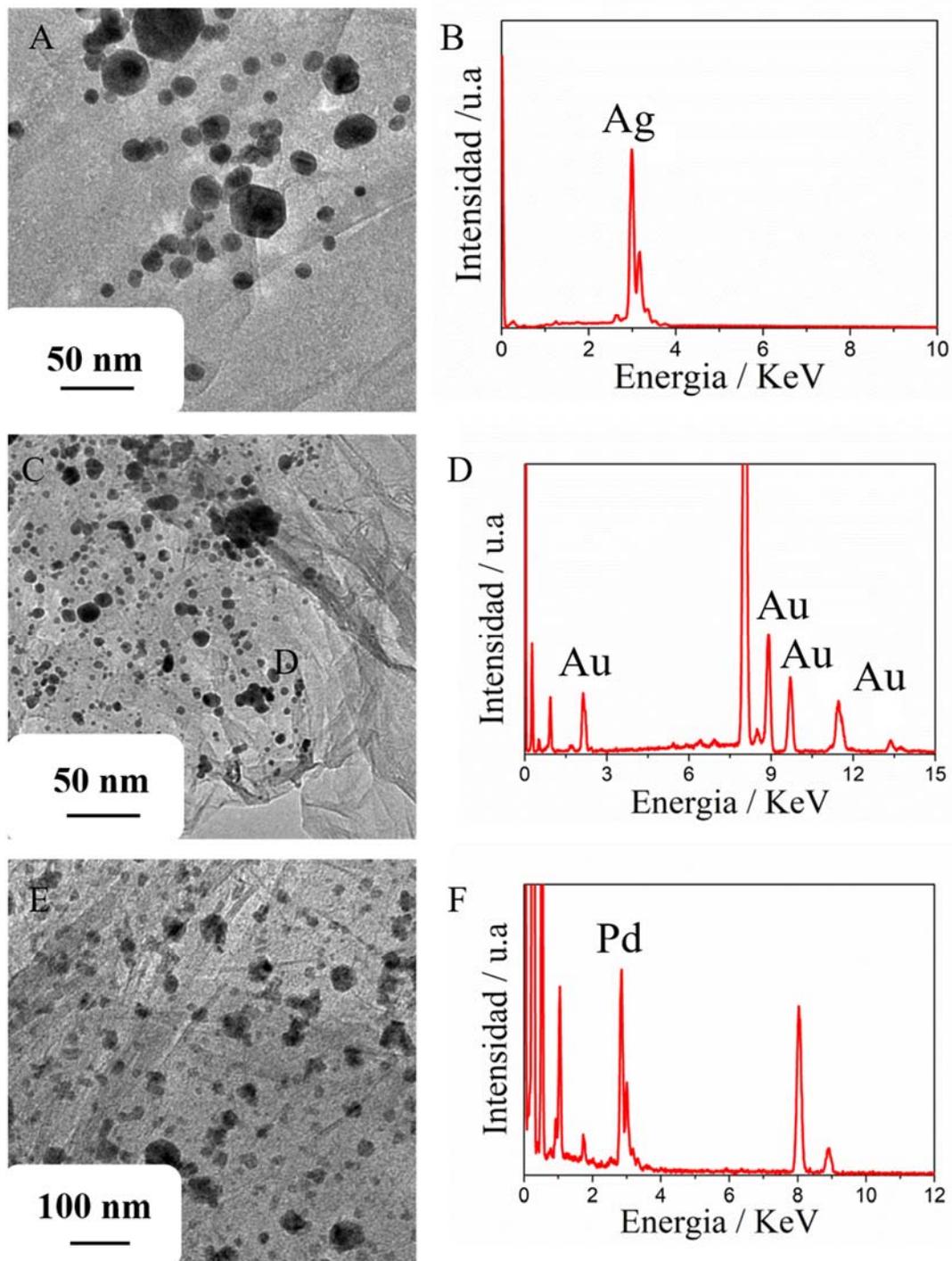
**Figura 5.6** Esquema de la estrategia sintética implementada para la reducción de GO y funcionalización simultánea de rGO con NPs@rGO.

El método propuesto, permite la incorporación de NPs en la superficie del rGO, gracias a los grupos funcionales que contiene el GO. Estos grupos sirven como puntos de nucleación para el crecimiento de las NPs. Los iones metálicos interaccionan con los grupos funcionales del GO y después son reducidos con  $\text{NaBH}_4$ , el cual reduce simultáneamente al GO y a los cationes metálicos, obteniendo una dispersión homogénea de NPs en la superficie del material conductor rGO. Las NPs generadas son *químico* y *físico* adsorbidas en la superficie del rGO. El resultado es que no solo se encuentran NPs en estos grupos oxidados sino también sobre la estructura de carbonos.

### 5.2.1 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas de Ag, Au y Pd

La alta dispersión que tiene el GO en medios polares, permitió la fácil funcionalización de los grupos oxidados en la superficie del GO por iones  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{AuCl}_4^-$ ,  $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ . Se ha de destacar que, en realidad, el GO no se disuelve en agua, sino que se dispersa en ésta debido a los grupos polares que posee. Éstos permiten que las láminas de GO se separen y se mantengan estables rodeadas de moléculas de agua, lo que facilita su funcionalización.<sup>26</sup> Por otro lado, en referencia a los iones utilizados en la funcionalización se debe diferenciar entre cationes y aniones. En el caso de los cationes las fuerzas intermoleculares de ion-dipolo y catión- $\pi$  son las fuerzas predominantes. Pero, en el caso del anión  $\text{AuCl}_4^-$ , es de esperar que la fuerza predominante sea principalmente una interacción anión- $\pi$ . Como se puede observar en la Figura 5.7 (A, C, E), después de la etapa de reducción con  $\text{NaBH}_4$  se obtuvo un nanomaterial híbrido formado por rGO y NPs de Ag, Au y Pd. Las micrografías HR-TEM muestran la formación de NPs de Ag, Au, y Pd (Figura 5.7 A, C, E) de las tres síntesis realizadas. Teniendo en cuenta que el tiempo de funcionalización de los grupos oxidados del GO y que los tiempos de reducción con  $\text{NaBH}_4$  fueron los mismos en las tres metodologías, la diferencia de tamaño que existe entre las distintas NPs es debida a una velocidad y estabilización de crecimiento diferente entre ellas.

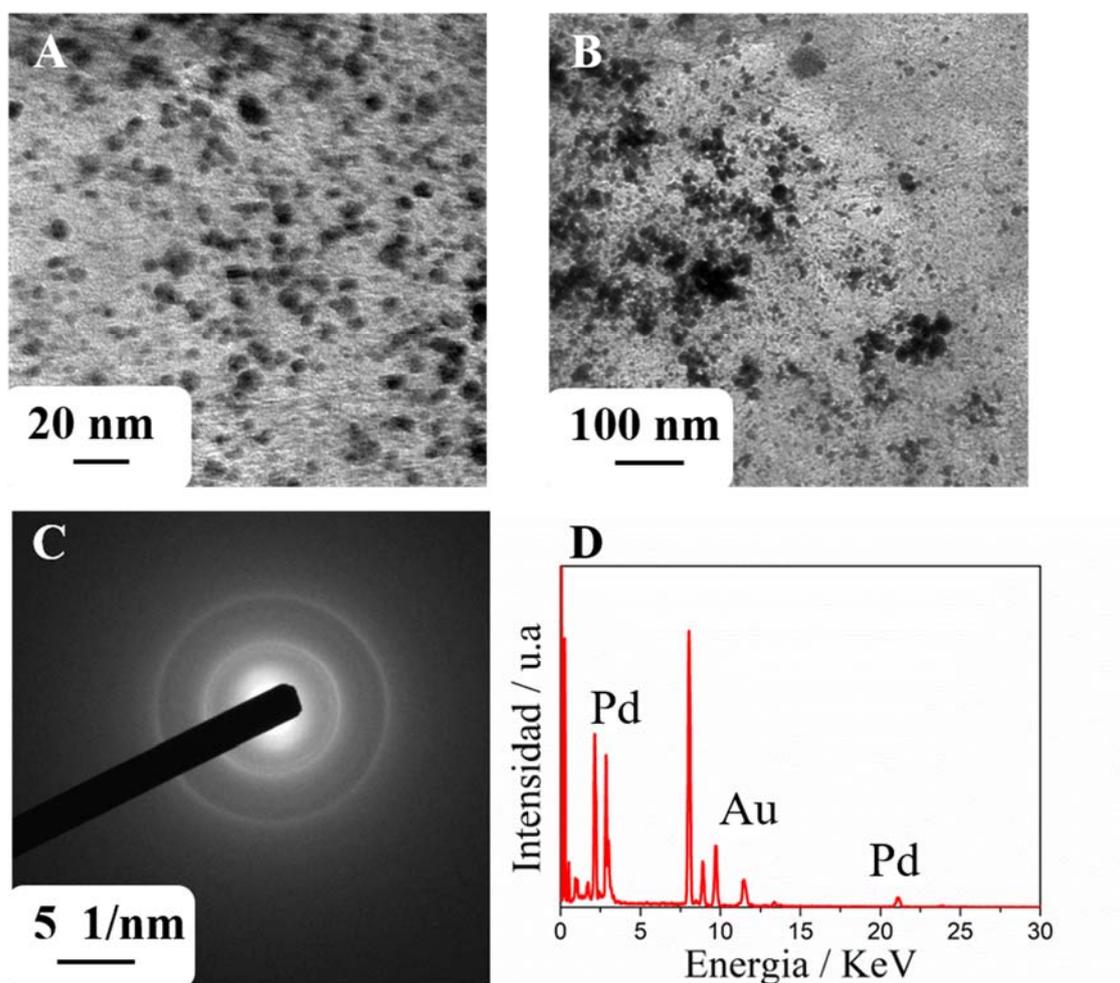
Durante la caracterización de estos materiales, se esperaba que, en el caso de la Ag y el Au, obtener un espectro de extinción donde se la banda UV-vis del rGO estuviera centrada sobre 267 nm, así como la banda de absorción plasmónica de las NPs de Ag y Au (Figura 5.7 B, D). En ninguno de los casos se observó dicha banda, con lo que se concluyó que podría ser debido a un *quenching* electrónico por la aglomeración de las NPs, o asociado a que el coeficiente de extinción del rGO sea muy superior al de las NPs, por lo que las bandas de absorción quedan solapadas bajo el espectro de extinción del rGO.



**Figura 5.7** Micrografía HR-TEM de rGO funcionalizado con NPs de (A). Espectro EDX Ag-NPs@rGO (B). Micrografía HR-TEM de rGO funcionalizado con NPs de Au (C). Espectro EDX de Au-NP@rGO (D). Micrografía HR-TEM de rGO funcionalizado con NPs de Pd (E). Espectro EDX de Pd-NP@rGO (F).

### 5.2.2 Funcionalización de óxido de grafeno reducido con nanopartículas bimetalicas de Au/Pd

En la bibliografía se pueden encontrar bastantes publicaciones en las que la oxidación del peróxido de hidrógeno es catalizada por aleaciones de Au y Pd,<sup>27-31</sup> en concreto la relación 2:3 resulta una de las más eficaces.<sup>32</sup> Con el objeto de aprovechar este efecto sinérgico, se procedió a la síntesis *in-situ* de NPs bimetalicas formadas a partir de Au y Pd. La síntesis es relativamente parecida a la que se ha detallado en la sección anterior (5.2.1) para las NPs de Ag, Au y Pd. Sin embargo, en este caso en la primera etapa se introducen a la vez las dos sales precursoras del metal (Figura 5.6) y, posteriormente, se procede a la reducción química simultánea con NaBH<sub>4</sub> de ambos cationes y del GO.

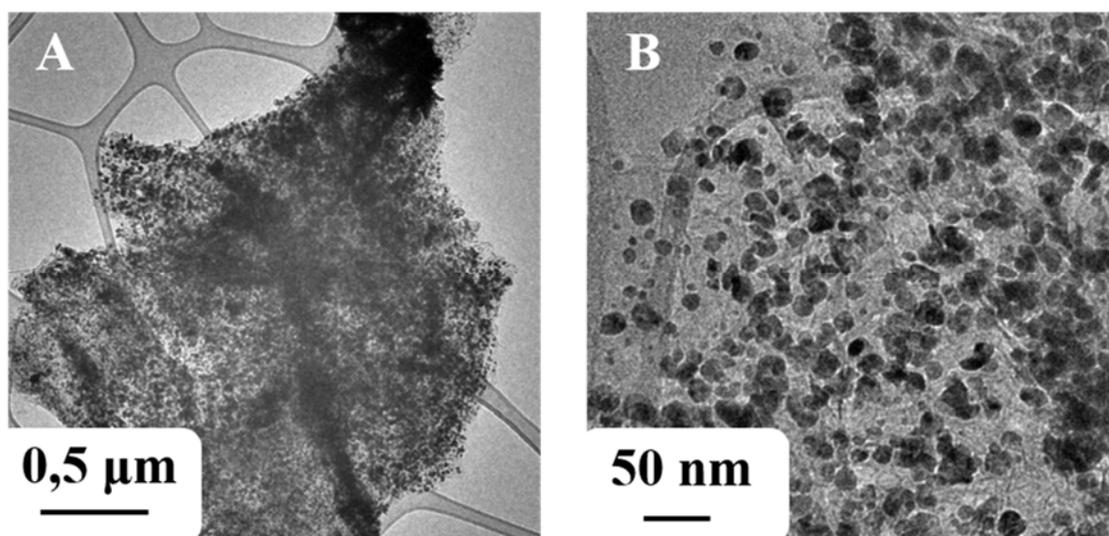


**Figura 5.8** Micrografías HR-TEM pertenecientes a Au/Pd-NP@rGO a distinta escala: 20 nm (A) y 100 nm (B). patrón de difracción de electrones, y EDX perteneciente a 2Au/3Pd-NP@rGO (C, D).

Para asegurar que la relación final entre Au/Pd en las NPs era la idónea, se realizó la síntesis partiendo de una relación de sales adecuada, donde la relación molar de ambos metales fue 2:3 Au/Pd y otra en que la relación era 1:2 Au/Pd. El resultado obtenido es un nuevo nanomaterial *bifuncionalizado* con ambos metales y cuya superficie contiene NPs mixtas de Au/Pd.

En la Figura 5.8 (A, B) se muestran las micrografías HR-TEM del nuevo nanomaterial híbrido sintetizado. En estas se puede observar una buena dispersión de NPs sobre la superficie del rGO, con un tamaño medio de NP aproximado de 5 nm. En la Figura 5.8 (C y D) se muestra el espectro de difracción de electrones, confirmando la presencia de una estructura cristalina que no pertenece al rGO sino a las NPs formadas sobre su superficie.

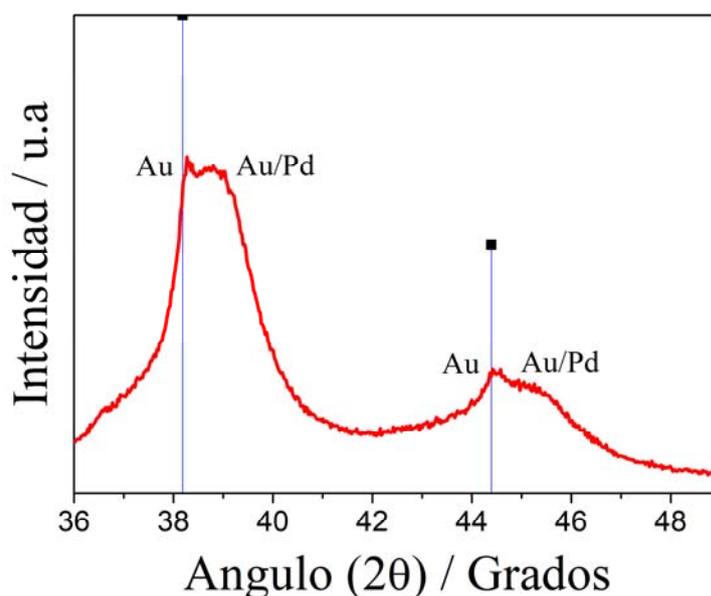
El espectro EDX obtenido confirma la presencia de ambos metales, Au y Pd, en las NPs formadas presentes en la superficie del rGO. También parece indicar que además de las partículas *bimetálicas* de Au/Pd se obtienen NPs de Au independientes. Por otro lado, cabe destacar que, con estos resultados obtenidos (Figura 5.8 C y D), no fue posible establecer la relación de Au/Pd en las NPs *bimetálicas*, ni tampoco el porcentaje obtenido de Au-NPs respecto a 2Au/3Pd-NPs. La caracterización posterior de este material híbrido intenta elucidar estas cuestiones. En la Figura 5.9 se pueden observar las micrografías HR-TEM respecto al nanomaterial 1Au/2Pd-NPs@rGO



**Figura 5.9** Micrografías HR-TEM pertenecientes a 1Au/2Pd-NPs@rGO a distinta escala: 0,5  $\mu\text{m}$  (A) y 50 nm (B)

### 5.2.2.1 Caracterización cristalográfica por rayos-X

La difracción de rayos-X en polvo es una técnica muy útil para elucidar estructuras cristalinas. Con el objetivo de conocer la naturaleza de las NPs formadas sobre la superficie del rGO, se procedió al estudio cristalográfico de una muestra del material híbrido obtenido. Se caracterizó la muestra de 2Au/3Pd-NP@rGO mediante difracción en polvo de rayos X. En la figura 5.10 se puede observar el patrón de difracción de 2Au/3Pd-NP@rGO perteneciente a la zona donde coinciden las fases cristalinas de una celda de Au y una aleación de Au/Pd. Se puede afirmar que las nanopartículas están formadas por una fase sólida de Au ( $\approx 38^\circ$  y  $44^\circ$ ) y otra fase correspondiente a una aleación de Au/Pd ( $\approx 39^\circ$  y  $45^\circ$ ). No se pudo determinar el porcentaje de cada una de las fases en el material funcionalizado (NPs@rGO), debido a la insuficiencia de picos obtenidos.



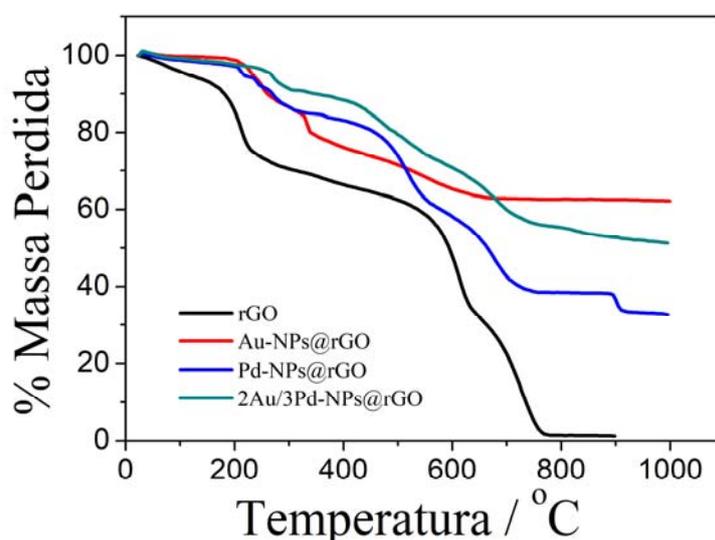
**Figura 5.10** Patrón de difracción de rayos x en polvo (XRD) del material híbrido sintetizado.

### 5.2.3 Termogravimetría de los materiales híbridos sintetizados basados en óxido de grafeno reducido

El objetivo de este estudio es determinar el grado de funcionalización del rGO con los distintos metales en los materiales conductores sintetizados, utilizando el análisis por termogravimetría. Previamente a la construcción de sensores y biosensores se determinó la cantidad de metal total depositado sobre la superficie del rGO.

En la Figura 5.10 se muestra el análisis termogravimétrico de todos los nanomateriales sintetizados menos el Ag-NP@rGO. Esta determinación no se llevó a cabo por el carácter reductor de la Ag y su tendencia a oxidarse a potenciales bajos, motivo por el que se plantearon dudas sobre su eficacia como material para la construcción de (bio)sensores. Las termogravimetrías obtenidas muestran como todo el rGO se descompone en H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> al llegar a 800°C. La línea roja perteneciente a Au-NP@rGO muestra una cantidad total de Au del 62% después de eliminar todo el rGO. Este resultado sorprende positivamente al compararlo con materiales similares en la bibliografía que presentan un grado de funcionalización mucho menor. La cantidad de Pd en Pd-NP@rGO es del 33 %. Mientras que la cantidad de metal total (Au y Pd) en el nanomaterial 2Au/3Pd-NP@rGO funcionalizado con nanopartículas bimetálicas de Au y Pd es del 51%.

Estos resultados revelan que hay un número muy elevado de NPs sobre la superficie de los materiales híbridos sintetizados en bases a rGO. En los casos analizados las cantidades de metal depositado en la superficie del rGO, son ligeramente superiores a las encontradas en la bibliografía y podría ser debido al gran número de grupos oxidados que contiene el GO, lo cual favorece la carga de estos grupos con cationes metálicos, para posteriormente reducir estos iones a su estado de oxidación 0.



**Figura 5.10** Termogravimetría de los nanomateriales híbridos obtenidos utilizados en la construcción de (bio)sensores.

## 5.6 Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas de esta parte del trabajo experimental son las siguientes:

- La vía de síntesis de NPs metálicas mediante la funcionalización de la resina catiónica C100-E, su uso como matriz, y su posterior calcinación, no llegó a ser totalmente satisfactoria debido a la incompleta calcinación de la resina que impidió la recuperación de las NPs sintetizadas de forma aislada.
- Se ha establecido un método general que permite funcionalizar rGO con NPs de diferentes metales. Se ha obtenido rGO funcionalizado con NPs metálicas de Ag, Au, Pd, y *bimetálicas* de Au/Pd en diferentes porcentajes en el material híbrido final. El método de síntesis implementado para la funcionalización de rGO con distintas nanopartículas metálicas, resulta robusto y extrapolable a cualquier metal que pueda ser reducido con NaBH<sub>4</sub>.
- Los experimentos termogravimétricos muestran un alto grado de funcionalización de rGO con NPs metálicas. Con los resultados obtenidos se ha podido concluir que el alto porcentaje de metal alcanzado está asociado con la propia naturaleza del material de partida. Durante la oxidación del grafito utilizado a GO se introducen un gran número de grupos funcionales, los cuales actúan como centros de nucleación para las NPs metálicas con que se ha funcionalizado el rGO.

## 5.7 Bibliografía

- (1) Qiao, Y.; Li, X.; Hirtz, T.; Deng, G.; Wei, Y.; Li, M.; Ji, S.; Wu, Q.; Jian, J.; Wu, F.; Shen, Y.; Tian, H.; Yang, Y.; Ren, T. L. Graphene-Based Wearable Sensors. *Nanoscale* **2019**, *11* (41), 18923–18945.
- (2) Luo, X.; Morrin, A.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis* **2006**, *18* (4), 319–326.
- (3) Saravanan, A.; Kumar, P. S.; Karishma, S.; Vo, D. V. N.; Jeevanantham, S.;

- Yaashikaa, P. R.; George, C. S. A Review on Biosynthesis of Metal Nanoparticles and Its Environmental Applications. *Chemosphere* **2021**, *264*, 128580.
- (4) Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; John Thomas, P.; Edwards, P. P. Size-Dependent Chemistry: Properties of Nanocrystals. *Chem. - A Eur. J.* **2002**, *8* (1), 28–35.
- (5) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes*; 2005; Vol. 36.
- (6) Silva, T. A. G.; Ferraz, C. P.; Gonçalves, R. V.; Teixeira-Neto, E.; Wojcieszak, R.; Rossi, L. M. Restructuring of Gold-Palladium Alloyed Nanoparticles: A Step towards More Active Catalysts for Oxidation of Alcohols. *ChemCatChem* **2019**, *11* (16), 4021–4027.
- (7) Wang, Q.; Cui, X.; Guan, W.; Zhang, X.; Liu, C.; Xue, T.; Wang, H.; Zheng, W. A Nanoflower Shaped Gold-Palladium Alloy on Graphene Oxide Nanosheets with Exceptional Activity for Electrochemical Oxidation of Ethanol. *Microchim. Acta* **2014**, *181* (3–4), 373–380.
- (8) Al-Ansi, N.; Salah, A.; Adlat, S.; Qi, B. A Highly Sensitive Nonenzymatic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensor Based on 3D N-Doped Porous Graphene Aerogel Decorated with AuPd Alloy Nanoparticles. *Synth. Met.* **2020**, *264* (March), 116380.
- (9) Yin, S.; Zhao, L.; Ma, Z. Label-Free Electrochemical Immunosensor for Ultrasensitive Detection of Neuron-Specific Enolase Based on Enzyme-Free Catalytic Amplification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (4), 1279–1286.
- (10) de O. Pereira, M. L.; de Souza Paiva, R.; Vasconcelos, T. L.; Oliveira, A. G.; Oliveira Salles, M.; Toma, H. E.; Grasseschi, D. Photoinduced Electron Transfer Dynamics of AuNPs and Au@PdNPs Supported on Graphene Oxide Probed by Dark-Field Hyperspectral Microscopy. *Dalt. Trans.* **2020**, 16296–16304.
- (11) Thanh, T. D.; Balamurugan, J.; Lee, S. H.; Kim, N. H.; Lee, J. H. Novel Porous Gold-Palladium Nanoalloy Network-Supported Graphene as an Advanced Catalyst for Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Sensing. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 669–678.

- (12) K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. G. and A. A. F. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *2016*, *306* (5696), 666–669.
- (13) Bollella, P.; Fusco, G.; Tortolini, C.; Sanzò, G.; Favero, G.; Gorton, L.; Antiochia, R. Beyond Graphene: Electrochemical Sensors and Biosensors for Biomarkers Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *89*, 152–166.
- (14) Suvarnaphaet, P.; Pechprasarn, S. Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors (Switzerland)* **2017**, *17* (10).
- (15) Allen, M. J.; Tung, V. C.; Kaner, R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (1), 132–145.
- (16) Castro Neto, A. H.; Guinea, F.; Peres, N. M. R.; Novoselov, K. S.; Geim, A. K. The Electronic Properties of Graphene. *Rev. Mod. Phys.* **2009**, *81* (1), 109–162.
- (17) Muñoz, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Modified Multiwalled Carbon Nanotube/Epoxy Amperometric Nanocomposite Sensors with CuO Nanoparticles for Electrocatalytic Detection of Free Chlorine. *Microchem. J.* **2015**, *122*, 189–196.
- (18) Muñoz, J.; Riba-Moliner, M.; Brennan, L. J.; Gun'ko, Y. K.; Céspedes, F.; González-Campo, A.; Baeza, M. Amperometric Thyroxine Sensor Using a Nanocomposite Based on Graphene Modified with Gold Nanoparticles Carrying a Thiolated  $\beta$ -Cyclodextrin. *Microchim. Acta* **2016**, *183* (5), 1579–1589.
- (19) Yao, N.; Hu, Y. L. Recent Progress in the Application of Ionic Liquids in Electrochemical Oxidation and Reduction. *J. Chem. Soc. Pakistan* **2019**, *41* (2), 264–292.
- (20) Prof, F.; Royal, C.; Acadd, I. Pour Le Institution , Foreign Associate of the Acad . Sciences , Paris , Ord . Bortuss . Modena , Stockholm , Munich , Bruxelles , Vienna , Bologna , of the Legion of Honour , & c . & C . *Society* **2012**, *147* (1857), 145–181.
- (21) Nehl, C. L.; Hafner, J. H. Shape-Dependent Plasmon Resonances of Gold Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (21), 2415–2419.

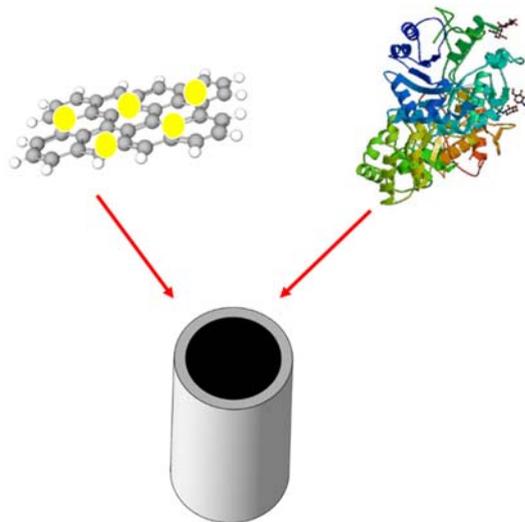
- (22) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Stenbock-Fermor, A.; Muñoz, M.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Tsarkova, L. A.; Baeza, M. Intermatrix Synthesis as a Rapid, Inexpensive and Reproducible Methodology for the in Situ Functionalization of Nanostructured Surfaces with Quantum Dots. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *368*, 417–426.
- (23) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, J.; Vigués, N.; Muraviev, D. N.; Céspedes, F.; Mas, J.; Baeza, M.; Muñoz, M. Intermatrix Synthesis of Ag, AgAu and Au Nanoparticles by the Galvanic Replacement Strategy for Bactericidal and Electrocatalytically Active Nanocomposites. *New J. Chem.* **2016**, *40* (12), 10344–10352.
- (24) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, M.; Ruiz, P.; Muraviev, D. N. Morphological Changes of Gel-Type Functional Polymers after Intermatrix Synthesis of Polymer Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 1–4.
- (25) Bastos-Arrieta, J.; Muñoz, M.; Muraviev, D. N. Bi-Functional Polymer-Metal Nanocomposites: Modification of Ion-Exchange Materials with Silver Nanoparticles. *Solvent Extr. Ion Exch.* **2015**, *33* (2), 152–165.
- (26) Konkana, B.; Vasudevan, S. Understanding Aqueous Dispersibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide through pK<sub>a</sub> Measurements. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (7), 867–872.
- (27) Su, B.; Shao, H.; Li, N.; Chen, X.; Cai, Z.; Chen, X. A Sensitive Bisphenol A Voltammetric Sensor Relying on AuPd Nanoparticles/Graphene Composites Modified Glassy Carbon Electrode. *Talanta* **2017**, *166* (December 2016), 126–132.
- (28) Chen, X.; Chen, X.; Cai, Z.; Oyama, M. AuPd Bimetallic Nanoparticles Decorated on Graphene Nanosheets: Their Green Synthesis, Growth Mechanism and High Catalytic Ability in 4-Nitrophenol Reduction. *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2* (16), 5668–5674.
- (29) Yang, J.; Deng, S.; Lei, J.; Ju, H.; Gunasekaran, S. Electrochemical Synthesis of Reduced Graphene Sheet-AuPd Alloy Nanoparticle Composites for Enzymatic Biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *29* (1), 159–166.
- (30) Frank, A. J.; Rawski, J.; Maly, K. E.; Kitaev, V. Environmentally Benign

- Aqueous Oxidative Catalysis Using AuPd/TiO<sub>2</sub> Colloidal Nanoparticle System Stabilized in Absence of Organic Ligands. *Green Chem.* **2010**, *12* (9), 1615–1622.
- (31) Ge, S.; Zhao, J.; Wang, S.; Lan, F.; Yan, M.; Yu, J. Ultrasensitive Electrochemiluminescence Assay of Tumor Cells and Evaluation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on a Paper-Based Closed-Bipolar Electrode by in-Situ Hybridization Chain Reaction Amplification. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102* (September 2017), 411–417.
- (32) Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S. Amperometric Glucose Biosensor Based on an Electrocatalytically Bulk-Modified Epoxy-Graphite Biocomposite. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *284* (1), 21–26.

# Capítulo 6

Desarrollo de biosensores amperométricos basados en materiales compósitos híbridos nanoestructurados

---





## CAPÍTULO 6

### **Desarrollo de biosensores amperométricos basados en materiales compósitos híbridos nanoestructurados**

La construcción de sensores amperométricos en base a los nuevos materiales híbridos desarrollados, ha permitido mejorar notablemente las propiedades electroquímicas de los (bio)sensores finales. Las propiedades sinérgicas que aportan estos materiales permiten obtener un material nanoestructurado de propiedades mejoradas que proporciona estrategias complementarias para el desarrollo de (bio)sensores, tanto desde el punto de vista del incremento de actividad catalítica del transductor, como de la vía de funcionalización previa a la construcción de estos compósitos con moléculas de reconocimiento molecular biológico.

Una vez sintetizados y caracterizados los materiales basados en rGO funcionalizado con NPs metálicas, se procedió a la construcción de transductores compósitos nanoestructurados utilizando como material conductor los nanomateriales: Au-NP@rGO, Pd-NP@rGO y Au/Pd-NP@rGO, este último en dos relaciones distintas 2Au/3Au y 1Au/2Pd. Se construyeron electrodos nanocompósitos con diferente carga de material conductor y se evaluó su efecto catalítico frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante técnicas voltamperométricas.

Después se procedió a la construcción de (bio)sensores nanocompósitos desarrollados con materiales híbridos basados en NPs *bimetálicas* (2Au/3Pd-NP@rGO). Como prueba de concepto de las capacidades electroquímicas de estos nuevos materiales híbridos y su funcionalidad para el desarrollo de biosensores, fueron modificados con la enzima glucosa oxidasa (GOD) para la determinación de glucosa. Los biosensores han sido caracterizados electroquímicamente por CV y evaluados electroanalíticamente.

Finalmente, con el objetivo de mejorar la selectividad de este tipo de biosensores amperométricos, se ha implementado la estrategia de medidas diferenciales para eliminar de la señal analítica la contribución a la señal de las interferencias presentes. Este estudio se ha llevado a cabo utilizando como sustancia interferente modelo el ácido ascórbico y dos (bio)sensores electroquímicamente equivalentes.

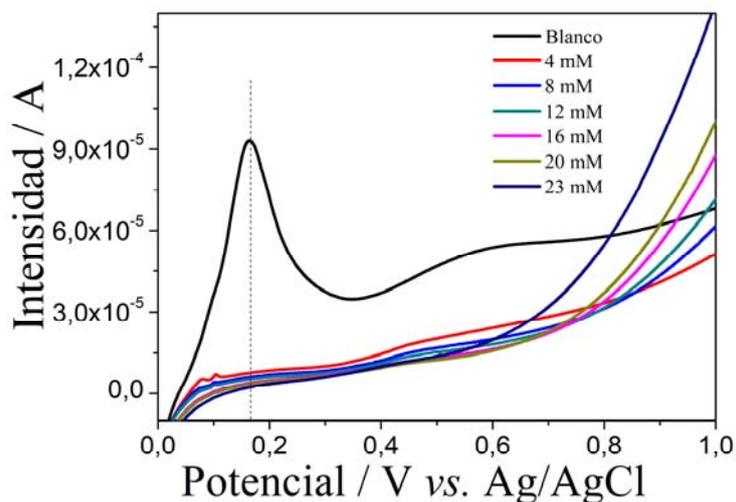
### 6.1 Electrodo compósito nanoestructurado basado en óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas metálicas

Después de sintetizados y caracterizados los nanomateriales híbridos basados en rGO funcionalizado con diversos tipos de NPs metálicas, se procedió a la construcción de transductores compósitos utilizando como material conductor estos nanomateriales. En este capítulo se detallan los resultados obtenidos con el rGO funcionalizado con los tres metales utilizados: Ag, Au, Pd y Au/Pd. Se ha estudiado la variación de composición de material conductor (NPs@rGO) en el nanocompósito y el efecto catalítico de los metales. Los electrodos construidos se caracterizaron electroquímicamente, mediante voltamperometría cíclica. También se caracterizaron electroanalíticamente utilizándolos en la detección de analitos de referencia, como ácido ascórbico. Se evaluó la capacidad catalítica de estos sensores frente al peróxido de hidrógeno, mediante voltamperometría de barrido lineal.

#### 6.1.1 Electrodo nanocompósito basado en óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas de Ag

En primer lugar, se estudió la respuesta de los electrodos con rGO funcionalizado con NPs de Ag. Es decir, los que contenían como material conductor Ag-NP@rGO. Inicialmente se construyó un electrodo con una composición de 13% de Ag-NP@rGO. Se seleccionó esta composición por ser una composición correspondiente a la NPC (ver sección 4.1.4) que aseguraba unas óptimas propiedades electroquímicas de los transductores. Pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que los electrodos

con esta composición resultaron ser muy poco conductores. Este comportamiento se puede explicar teniendo en consideración el porcentaje de NPs de Ag en el material conductor. A pesar de no disponer de información sobre el porcentaje de Ag en rGO, porque no se realizó el análisis termogravimétrico, se puede hipotetizar que este resultado está relacionado con que la cantidad de AgNPs ( $\approx 33\text{-}50\%$ ) es relativamente alta en relación con el rGO. Resultando en una cantidad efectiva de rGO en el nanocompósito inferior a la necesaria para que el transductor sea conductor, porque la composición relativa de rGO ( $< 7\%$ ) se encontraría en la zona de HRC. Por lo que las partículas conductoras de rGO estarían separadas en el material compuesto debido a la alta carga de NPs de Ag. Por este motivo, se procedió a la construcción de transductores incorporando como material conductor una proporción 10:2 de grafeno, sin y con NPs de Ag, utilizándose una mezcla rGO (10%) y Ag-NP@rGO (2%).



**Figura 6.1** Voltamperograma de barrido lineal obtenido para el electrodo de composición 10% rGO + 2% Ag-NP@rGO, en una disolución 0,1 M de PBS con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Velocidad de barrido 10 mV/s.

Los resultados obtenidos mostraron que el transductor de esta composición era lo suficientemente conductor para realizar medidas voltamperométricas. Este hecho corrobora la hipótesis inicial, en la que se planteaba que, la alta carga de NPs de Ag en el material compósito provoca la separación de las partículas conductoras que se encuentran en cantidad insuficiente para que el material resultante sea conductor. Para la realización del estudio de las propiedades electroanalíticas de los electrodos, se procedió a determinar inicialmente el potencial de polarización para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la Figura 6.1 se muestra el voltamperograma obtenido para la oxidación del peróxido de hidrógeno. En él se puede

observar la oxidación de la Ag a  $Ag_2O$  a un potencial de 0,18 V. Este resultado evidencia que durante la realización del blanco se oxidan la mayoría de las NPs metálicas de Ag presentes en la superficie del sensor, por lo que se reduce el efecto catalítico al encontrarse la Ag como  $Ag_2O$ . Esto sucede antes incluso de llegar a potenciales más altos donde se puede producir la oxidación del  $H_2O_2$ . Como se puede observar en la Figura 6.1, los voltamperogramas lineales obtenidos después del blanco, para las distintas concentraciones de  $H_2O_2$  analizadas, no permiten identificar un potencial óptimo de oxidación del  $H_2O_2$ , resultando estos prácticamente iguales a los obtenidos para los sensores de rGO2 y la detección de  $H_2O_2$  mostrados en el capítulo 4 (Figura 4.9). Debido a los resultados obtenidos con el nanomaterial rGO:Ag-NP@rGO (10:2) se decidió no continuar con su uso en el desarrollo de (bio)sensores.

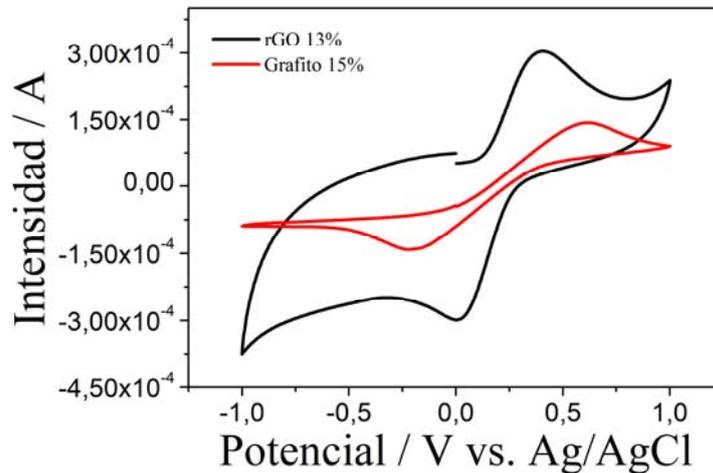
### 6.1.2 Electrodo modificado con óxido de grafeno reducido funcionalizado con nanopartículas metálicas de Au y Pd

Los resultados obtenidos con los transductores nanocompuestos de Ag-NP@rGO, evidencian que la alta carga de NPs en el grafeno funcionalizado hace inviable la construcción de sensores únicamente con este nanomaterial. Todos los transductores desarrollados a continuación están preparados con mezclas de rGO y NPs@rGO en composiciones distintas, según el tipo de NP metálica con la que ha sido funcionalizado el rGO. Donde el rGO se mantuvo entre 11 % - 12 % y los nanomateriales híbridos entre 2 % - 3 %, siendo la carga total de material conductor nanocompuesto en un 14 %.

Como referencia inicial, se construyeron electrodos nanocompuestos de dos materiales conductores distintos: grafito y rGO, ambos de composición correspondiente a la zona de percolación. Con el objetivo de comparar la respuesta de ambos materiales transductores de composición óptima y, por otro lado, la de los nanocompuestos rGO + NPs@rGO con el nanocompuesto que únicamente contiene rGO, se construyeron electrodos de grafito y rGO con una carga de material conductor de NPC del 15 % y 13 %, respectivamente.<sup>1</sup>

Se comparó la respuesta electroquímica de ambos transductores. En la Figura 6.2 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para ambos electrodos. Se ha de destacar que el electrodo de 13 % rGO presenta una mayor actividad electroquímica que el electrodo con una composición de 15 % grafito. Además, la proximidad de los picos

de oxidación y reducción en el caso del electrodo basado en rGO con respecto al de grafito, muestra una mayor reversibilidad de la reacción electroquímica en la superficie del electrodo. En la Tabla 6.1 se detallan todos los parámetros electroquímicos obtenidos. Se puede observar como la  $\Delta E$  entre el pico de reducción y oxidación para el 13 % rGO, es mucho más pequeña (0,36 V) que la del grafito 15 % (0,84 V).

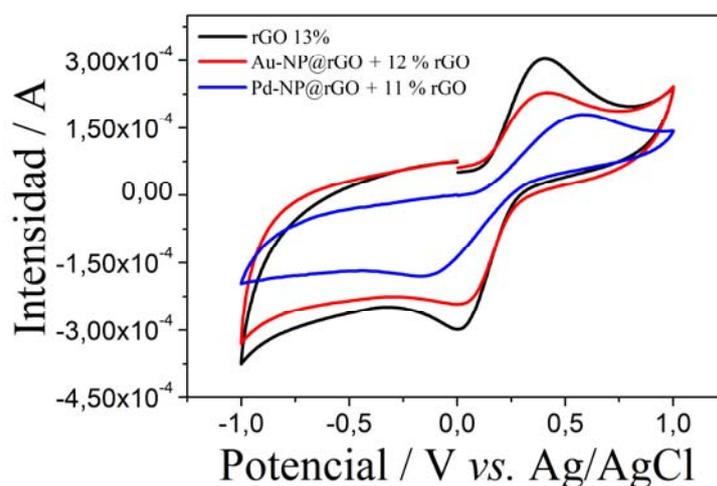


**Figura 6.2** Voltamperogramas cíclicos obtenidos para electrodos nanocompuestos de rGO 13% y grafito 15 %. Se utilizó una disolución de KCl 0,1M con una concentración equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,01M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

El electrodo de 13 % rGO tiene una  $R_{CT}$  ligeramente superior (51,8 %) a la del electrodo de 15% grafito, pero un área electroactiva mayor también en un 51,8 % a la del electrodo de grafito. Este resultado parece indicar que, si bien el electrodo de 13% rGO tiene una resistencia a la transferencia de carga superior a la del electrodo de 15% grafito, debido a la propia morfología de este material conductor, en forma de lámina, esta aporta una mayor área electroactiva en la superficie del electrodo. Es decir, aunque estas partículas conductoras interactúen menos entre ellas en la matriz del nanocompósito, se produce la suficiente transferencia electrónica entre estas para que el electrodo sea un transductor eficaz.

Este resultado corroboraría el comportamiento del electrodo de 13% rGO como un haz de microelectrodos, ya que a pesar de tener una  $R_{CT}$  el doble que la del electrodo de 15% grafito, presenta un comportamiento electroquímico muy distinto. La  $R_{CT}$  está asociada directamente con la separación de las partículas conductoras en el compósito. Los electrodos basados en rGO al tener un tamaño de partícula más pequeño muestran una  $R_{CT}$  mayor por lo que el contacto físico entre partículas es menor. Sin embargo, las

propiedades eléctricas del grafeno, con respecto a las partículas de grafito, hacen que el área electroactiva sea mucho mayor, lo que confiere a los electrodos basados en rGO unas características electroquímicas mucho más ventajosas con respecto a los electrodos basados en grafito.



**Figura 6.3** Voltamperogramas cíclicos obtenidos para los electrodos nanocompuestos basados en rGO funcionalizado con NPs metálicas. Se utilizó una disolución de KCl 0,1M con una concentración equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,01M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

En la Figura 6.3 se pueden observar los voltamperogramas cíclicos obtenidos para los electrodos combinados de NPs@rGO+rGO. En concreto, la composición de los transductores es de 2 % Au-NP@rGO + 12 % rGO y 3 % Pd-NP@rGO + 11 % rGO. Estas composiciones se han seleccionado en función de la carga de NPs en el rGO: 62% Au y 33% de Pd (§ 5.2.3), para mantener constante el porcentaje de NPs en el nanocompuesto. La respuesta electroquímica de estos transductores ha sido comparada con la composición de referencia (NPC), un electrodo de rGO con una carga de material conductor del 13%.

En la tabla 6.1 se recogen los valores de los parámetros electroquímicos obtenidos de las CVs. Como se puede comprobar la incorporación de NPs de Au y Pd en el material transductor produce variaciones en estos parámetros. En ambos casos, se observa una disminución en la intensidad de pico de oxidación y de reducción. La diferencia de potencial obtenida ( $\Delta E$ ) entre los picos, se mantiene prácticamente constante respecto a la del electrodo de 13 % rGO, aunque el área electroactiva disminuye ligeramente. Este comportamiento se puede explicar por dos factores, la disminución de carga de material conductor rGO en el nanocompuesto (entre 1 % para Pd y 2 % para Au) y la incorporación

de NPs metálicas de Au y Pd. En primer lugar, la disminución de porcentaje de rGO en la matriz del nanocompósito provoca el aumento de la distancia de las partículas conductoras y, por tanto, incrementa la  $R_{CT}$  del electrodo. En segundo lugar, la sustitución de rGO por NPs@rGO incrementa la distancia del material conductor en el nanocompósito. Este último efecto está asociado con el tamaño de las NPs metálicas, aunque se compensa la disminución de carga de rGO con el NPs@rGO presente. Se provoca un incremento de la distancia entre las láminas de grafeno del nanocompósito debido al propio tamaño de las NPs que provoca un distanciamiento adicional entre las partículas conductores del material.

**Tabla 6.1** Parámetros obtenidos de los voltamperogramas cíclicos de los transductores nanocompósitos construidos. Donde  $i_0$  es la intensidad de corriente de intercambio;  $R_{CT}$  es la resistencia a la transferencia de carga;  $I_p^c$  es la intensidad de pico de reducción; A es el área electroactiva;  $\Delta E$  es la diferencia de potenciales entre pico anódico y catódico, y  $R_{CT} \cdot A$  es la resistencia a la transferencia de carga normalizada respecto al área electroactiva.

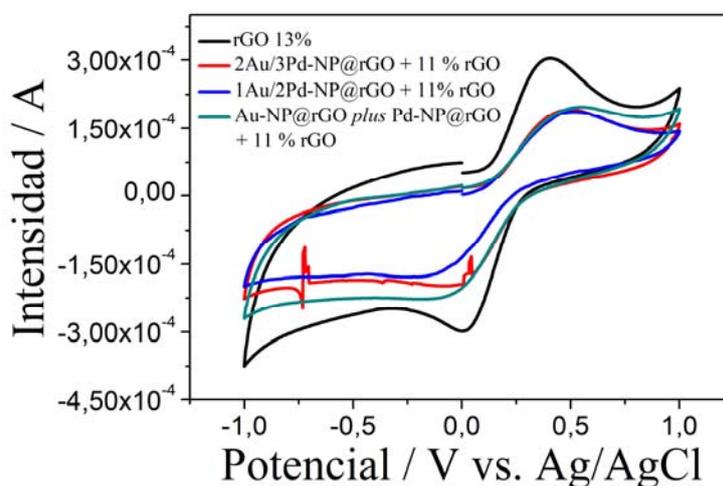
% rGO	$i_0$ (A)	$R_{CT}$ ( $\Omega$ )	$I_p^c$ (A)	A ( $cm^2$ )	$\Delta E$ (V)	$R_{CT} \cdot A$ ( $\Omega cm^2$ )
<b>13% rGO</b>	1,10E-04	229,46	-2,99E-04	0,56	0,395	128,50
<b>15% Grafito</b>	1,51E-04	166,55	-1,42E-04	0,27	0,836	44,97
<b>2 % Au-NP@rGO + 12 % rGO</b>	1,09E-04	231,91	-2,42E-04	0,45	0,400	104,36
<b>3 % Pd-NP@rGO + 11 % rGO</b>	3,36E-05	750,26	-1,81E-04	0,34	0,749	255,09

En concreto, el electrodo de 3 % Pd-NP@rGO presenta una  $R_{CT}$  superior en un 30 % a la de los otros electrodos, también se puede apreciar una notable disminución de las intensidades de pico de oxidación y reducción, así como del área electroactiva (ambas 39,3 %) respecto al electrodo 13 % rGO. La  $\Delta E$  aumenta considerablemente (0,749V) respecto al electrodo de 13% rGO (0,395 V), por lo que este electrodo presenta un comportamiento más parecido al de grafito del 15 %, que al del resto de electrodos. Esto puede deberse a un mayor distanciamiento entre partículas conductoras de grafeno por la presencia del material híbrido. El electrodo de Au-Np@rGO presenta una disminución del área electroactiva y de la  $I_p^c$  del 19,1 %, respecto al electrodo de 13 % rGO. Mientras que la  $\Delta E$  entre picos es aproximadamente la misma. Esto puede deberse a la propia

naturaleza de las partículas de Au sintetizadas y a la menor proporción de éstas en el material compuesto.

Las diferencias observadas para el electrodo con NPs de Pd respecto al electrodo con NPs de Au, parecen estar asociadas solo con el porcentaje superior de Pd-NP@rGO en el nanocompuesto, ya que el radio atómico de las NPs de Au (174 pm) es superior a las NPs de Pd (137 pm), por lo que el efecto del tamaño atómico, por la relación de tamaños debería ser el contrario y separar menos las partículas conductoras. La diferencia de 1% entre ambas composiciones (2% Au-NP@rGO + 12% rGO vs. 3% Pd-NP@rGO vs 11% rGO), provoca que, aunque la carga total de rGO se mantenga prácticamente constante, las NPs metálicas que funcionalizan el rGO, independientemente de su tamaño provoquen una repulsión entre las láminas de grafeno. Por tanto, el efecto de la composición predomina sobre el efecto del tamaño de las NPs que funcionalizan el rGO.

En la Figura 6.4 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para los electrodos desarrollados con materiales híbridos que contienen partículas *bimetálicas* y mezcla de dos tipos de grafeno funcionalizado con NPs metálicas de Au y Pd.



**Figura 6.4** Voltamperogramas cíclicos obtenidos para los electrodos nanocompuestos basados en nanomateriales híbridos de rGO *bifuncionalizado* con NPs metálicas de dos metales distintos. Todos los transductores nanocompuestos contienen **3 %** de material híbrido y **11 %** de rGO. En el caso del nanomaterial mixto la relación entre Au:Pd es 2:3. Se utilizó una disolución de KCl 0,1M con una concentración equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-}$  0,01M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

En concreto, las composiciones de los transductores nanocompuestos son 11 % de rGO + 3% de los distintos nanomateriales. Se han preparado las siguientes composiciones: 3 %

2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO; 3 % 1Au/2Pd-NP@rGO + 11% rGO y 3% (Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO) en proporción 2Au:3Pd + 11 % rGO.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto que tiene en la respuesta electroquímica del nanocompósito, la forma en que la nanopartícula se introduce en el nanomaterial transductor. Las CVs fueron realizadas en una disolución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,01 M, en un medio iónico de KCl 0,1 M. En la Tabla 6.2 se muestran los parámetros electroquímicos obtenidos para estos materiales transductores. Para simplificar la información mostrada en la tabla, se ha omitido en la columna de % rGO, el término que hace referencia a los nanocompósitos preparados con nanomateriales híbridos. Todos los transductores nanocompósitos contienen 3 % de material híbrido y 11 % de rGO. En el caso del nanomaterial mixto, la relación entre Au:Pd es 2:3.

**Tabla 6.2** Parámetros obtenidos de los voltamperogramas cíclicos de los transductores nanocompósitos construidos. Donde  $i_0$  es la intensidad de corriente de intercambio;  $R_{CT}$  es la resistencia a la transferencia de carga;  $I_p^c$  es la intensidad de pico de reducción; A es el área electroactiva;  $\Delta E$  es la diferencia de potenciales de pico anódico y catódico y  $R_{CT} \cdot A$  es la resistencia a la transferencia de carga normalizada respecto al área electroactiva. \*Todos los transductores nanocompósitos contienen 3 % de material híbrido y 11 % de rGO (para simplificar este se ha eliminado de la tabla). \*\*En el caso del nanomaterial mixto la relación entre Au:Pd es 2:3.

% rGO*	$i_0$ (A)	$R_{CT}$ ( $\Omega$ )	$I_p^c$ (A)	A ( $\text{cm}^2$ )	$\Delta E$ (V)	$R_{CT} \cdot A$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )
13% rGO	1,10E-04	229	-2,99E-04	0,56	0,395	128,50
3 % 2Au/3Pd-NP@rGO	5,95E-05	424	1,97E-04	0,37	0,536	156,88
3 % 1Au/2Pd-NP@rGO	3,91E-05	644	-1,77E-04	0,33	0,733	139,92
3 % Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO	6,10E-05	413	-2,27E-04	0,42	0,687	173,46
**						

Como se ha comentado en el capítulo anterior, el electrodo 2Au/3PdNPs@rGO y 1Au/2PdNPs@rGO difieren entre sí por la ratio de concentraciones de las sales precursoras utilizadas en sus síntesis; esta proporción está indicada en la nomenclatura utilizada para identificar cada uno de los nanomateriales híbridos. Mientras que el último electrodo es la combinación de grafeno funcionalizado con dos metales distintos obtenido

en dos síntesis independientes y después mezclados en una proporción 2Au:3Pd. De manera que este tipo de electrodo transductor, incorpora una mezcla Au@rGO y Pd@rGO en proporción 2:3 en el nanocompuesto. En general, como se ha visto antes (Tabla 6.1) los electrodos modificados con NPs muestran una  $R_{CT}$  superior a la del electrodo que sólo contiene solo rGO sin funcionalizar.

Se puede observar un comportamiento general en este tipo de materiales transductores. En este estudio con partículas *bimetálicas* y mezclas de dos tipos de NPs@rGO, se observa la misma tendencia que para los electrodos nanocompuestos construidos con rGO funcionalizado con un solo tipo de NPs metálicas. El área electroactiva disminuye, la separación del potencial  $\Delta E$  entre los picos de reducción y oxidación incrementa y, la  $R_{CT}$  incrementa de manera drástica respecto a la composición de 13 % rGO. El  $\Delta E$  entre picos incrementa en los tres transductores respecto al 13 % rGO, siendo superior este incremento para el transductor con 3 % de 1Au/2Pd@rGO (0,733 V), análogamente este es el transductor que posee una menor área electroactiva (41, 1% inferior a la del 13 % rGO) y presenta la mayor  $R_{CT}$  (64% superior a la del 13 % de rGO). Por otro lado, el área electroactiva del electrodo nanocompuesto de 3% de 2Au/3Pd-NP@rGO, presenta una disminución de área electroactiva similar al anterior del 39,9 % respecto al 13 % de rGO, pero un incremento de la  $R_{CT}$  algo inferior, del 45,5 % respecto al 13% de rGO. Siendo la separación entre picos algo menor que para el caso anterior (0, 536 V). En referencia al tercer transductor con una relación 2:3 de Au:Pd, con grafeno funcionalizado con ambos metales, se puede observar un comportamiento electroquímico equivalente al del transductor 2Au/3Pd-NP@rGO.

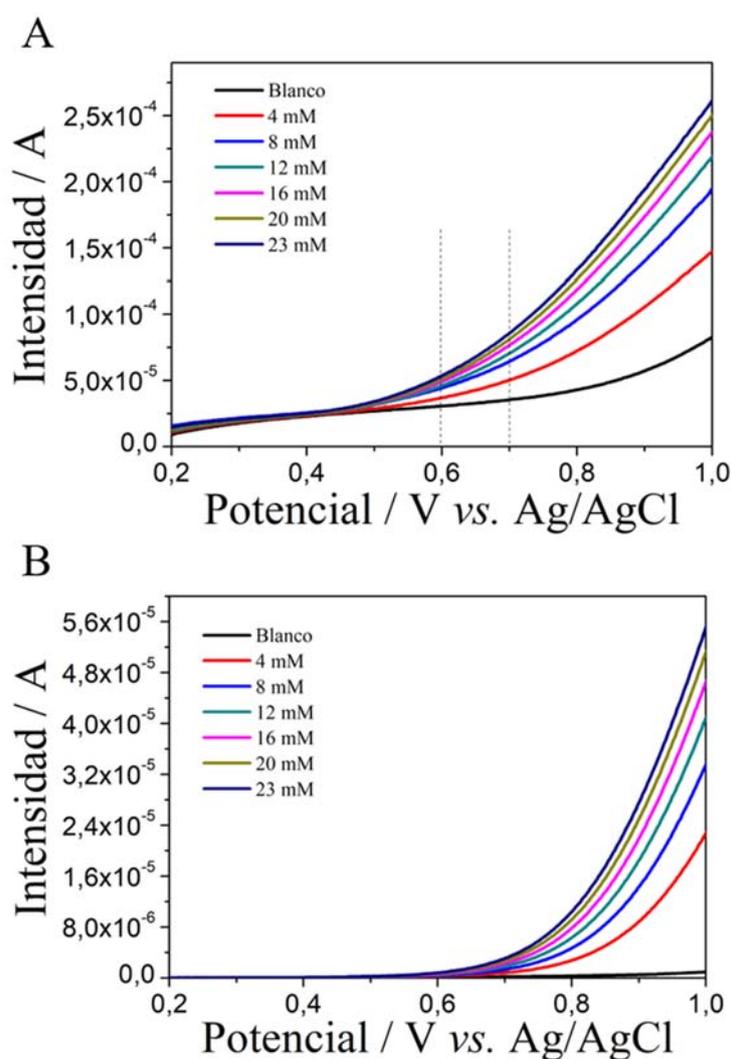
Por otro lado, la  $R_{CT}$  normalizada con el área electroactiva se mantiene en torno a valores similares para los tres transductores, no llegando a sobrepasar, en ningún caso, el 25,9 % de incremento respecto al valor del 13 % rGO. Se puede concluir que el efecto de la funcionalización de rGO con partículas *bimetálicas* o mezcla de NPs@rGO produce los mismos efectos observados para los nanocompuestos con un solo tipo de NPs metálicas.

Se puede concluir que, al igual que en el caso anterior, aunque la presencia de NPs metálicas produce la separación de las partículas conductoras de rGO dentro de la matriz del nanocompuesto provocando una reducción del área electroactiva e incrementando las otras variables  $R_{CT}$ ,  $\Delta E$  y  $R_{CT} \cdot A$ , el aumento de  $R_{CT}$  queda compensado por el área electroactiva del electrodo nanocompuesto y, podrán ser utilizados como transductores

electroquímicos eficaces. En el siguiente apartado se describe el estudio sobre el efecto catalítico de estas nanopartículas metálicas con el objetivo de definir su aplicación en electroanálisis.

### 6.1.3 Determinación del potencial de trabajo para la detección de peróxido de hidrogeno mediante voltamperometría de barrido lineal

Con el objetivo de evaluar la capacidad catalítica de los transductores construidos se determinó, mediante la técnica de voltamperometría de barrido lineal, el potencial de oxidación de  $H_2O_2$  de todos los electrodos nanocompósitos construidos previamente.



**Figura 6.5** Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de  $H_2O_2$ . Electrodo de 13 % rGO (A), 15 % grafito (B). Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

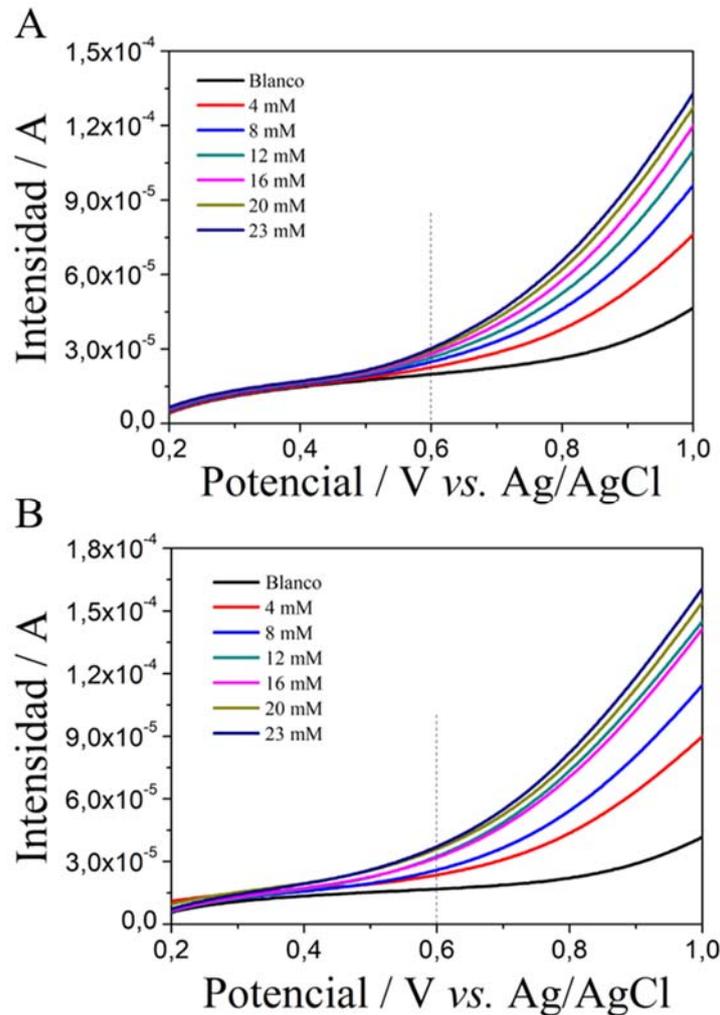
Las medidas fueron realizadas en PBS 0,1 M con fondo iónico de KCl 0,1M. Los resultados se han agrupado siguiendo el mismo orden de la sección anterior (§ 6.1.2). Comparando, en primer lugar, la respuesta de los electrodos de rGO/grafito y después los de NPs@rGO + rGO. Finalmente, se muestran los resultados de los materiales híbridos (rGO funcionalizado con partículas *bimetálicas*) + rGO y los nanocompuestos mixtos (Au-NP@rGO y Pd-NP@rGO).

En la Figura 6.5 se muestran los voltamperogramas obtenidos, para los electrodos nanocompuestos de 13% rGO y 15% grafito de composiciones NPC, en función de la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Se puede observar un importante efecto *catalítico* del electrodo de rGO respecto al del grafito que hace disminuir el potencial 200 mV. En el 13 % de rGO se puede observar cómo a un potencial de 0,6 V se produce la oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que para el electrodo de 15 % grafito no se observa la oxidación hasta alcanzar un potencial de, aproximadamente, 0,8 V.

Los resultados obtenidos permiten corroborar la eficacia de rGO como material alternativo para el desarrollo de transductores. Las propiedades electroquímicas mostradas por este material carbonáceo permitirán trabajar a potenciales de oxidación menores, lo que se traduce en un incremento de la selectividad de los (bio)sensores en su aplicación analítica. Se ha de destacar que la funcionalización de rGO con NPs, independientemente de la estrategia de funcionalización utilizada, facilita la incorporación de catalizadores dispersos de una manera homogénea en el material transductor. Esta dispersión eficaz confiere propiedades catalíticas añadidas al rGO; lo que a priori, provocará una disminución del potencial de oxidación y conllevará asociada una mejora de la selectividad del (bio)sensor final.

En la Figura 6.6 se muestran los resultados obtenidos para los electrodos funcionalizados con un único tipo de nanopartículas metálicas: Au-NP@rGO y Pd-NP@rGO. En la Figura 6.6 (A) se muestran los voltamperogramas lineales obtenidos con el electrodo de 2% Au-NP@rGO + 12 % rGO para distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observa que potencial de oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentra a 0,6 V. Por tanto, en este caso, las NPs metálicas de Au no modifican el potencial de oxidación obtenido para el electrodo de 13 % rGO. En la Figura 6.6 (B) se muestran los voltamperogramas obtenidos con el electrodo de 3% Pd-NP@rGO + 11 % rGO para distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se puede observar que las NPs metálicas de Pd, presentes en el transductor, hacen disminuir significativamente el

potencial de oxidación en más de 100 mV, hasta un potencial de 0,5 V. Por tanto, se observa un mayor efecto catalítico de los electrodos que contienen NPs de Pd respecto a los del Au.



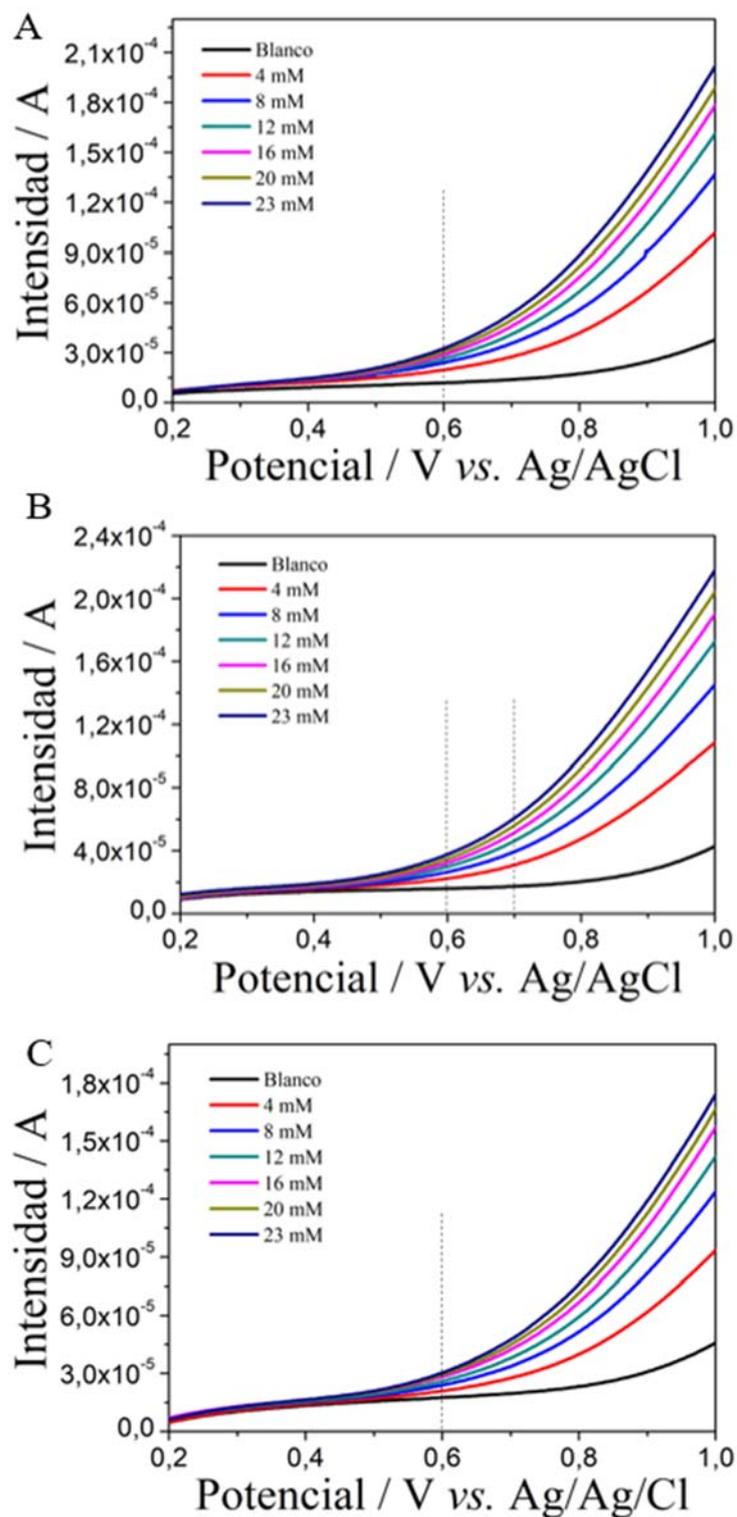
**Figura 6.6** Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Electrodo de 2 % Au-NP@rGO + 12 % rGO (A) y 3 % Pd-NP@rGO + 11 % rGO (B). Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

Este diferente comportamiento electroquímico puede explicarse por las diferencias observadas respecto al área electroactiva y la  $R_{CT}$  (Tabla 6.1). El electrodo que contiene 3% Pd-NP@rGO presenta una reducción del área electroactiva del 24,4 % respecto al de 2% Au-NP@rGO. Por otro lado, respecto a la  $R_{CT}$ , el electrodo con Pd incrementa su resistencia un 69 % y el producto  $R_{CT} \cdot A$  en un 59 %, respecto al de Au. Se puede concluir que el incremento de resistencia del transductor y la disminución del área electroactiva, asociados con la diferencia de composición de 1% superior para Pd-NP@rGO y el

distanciamiento de las partículas conductoras ocasionado, queda compensado por un mayor efecto catalítico de las NPs de Pd respecto a las NPs de Au en la oxidación de  $H_2O_2$ .

En la Figura 6.7 se muestran los resultados obtenidos para los electrodos construidos con rGO funcionalizado con NPs *bimetálicas* de Au/Pd (Figura 6.7 A y B) en dos proporciones distintas, y la mezcla de rGO funcionalizado con Au y Pd en proporción 2:3 (Figura 6.7 C). En todos los casos el porcentaje se mantuvo constante: 3 % de los distintos nanomateriales híbridos y 11 % de rGO. Se puede observar el efecto catalítico de las NPs metálicas en los tres tipos de electrodos. Respecto a los electrodos anteriores (Figura 6.6), no se obtienen diferencias significativas en el efecto catalítico de oxidación de  $H_2O_2$  y en todos los casos se obtiene un potencial alrededor de 0,6 V. Aunque el electrodo que marca un comportamiento un poco distinto a los otros electrodos es el electrodo de 3 % 2Au/3Pd-NP@rGO. Para este electrodo se obtiene un potencial de oxidación algo inferior al resto, alrededor de 0,55 V. Aunque las diferencias entre este electrodo y el de composición 3% 1Au/2Pd-NP@rGO son mínimas. El que tiene un peor comportamiento es el electrodo construido con mezcla de rGO funcionalizado con dos tipos de NPs metálicas. En este caso, la incorporación de grafeno funcionalizado en la matriz del nanocompósito no parece tan favorable ya que desplaza el potencial de oxidación hacia un potencial mayor de 0,6 V; aproximadamente de 0,650 V.

Los resultados obtenidos permiten concluir que los nanomateriales que contienen NPs metálicas de Pd parecen ser sensiblemente más eficientes en la oxidación de  $H_2O_2$  que los que solo contienen NPs metálicas de Au. Por otro lado, la mezcla de rGO funcionalizado con dos NPS distintas, no parece tener un claro efecto positivo. Por tanto, se puede concluir que los nanomateriales híbridos, obtenidos de rGO funcionalizado con NPs *bimétálicas*, son lo que presentan mejores propiedades catalíticas para la oxidación de  $H_2O_2$ .



**Figura 6.7** Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Electrodo de 3 % 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO (A), 3 % 1Au<sub>2</sub>/Pd-NP@rGO + 11 % rGO (B), 3 % (Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO) + 11 % rGO (C). Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

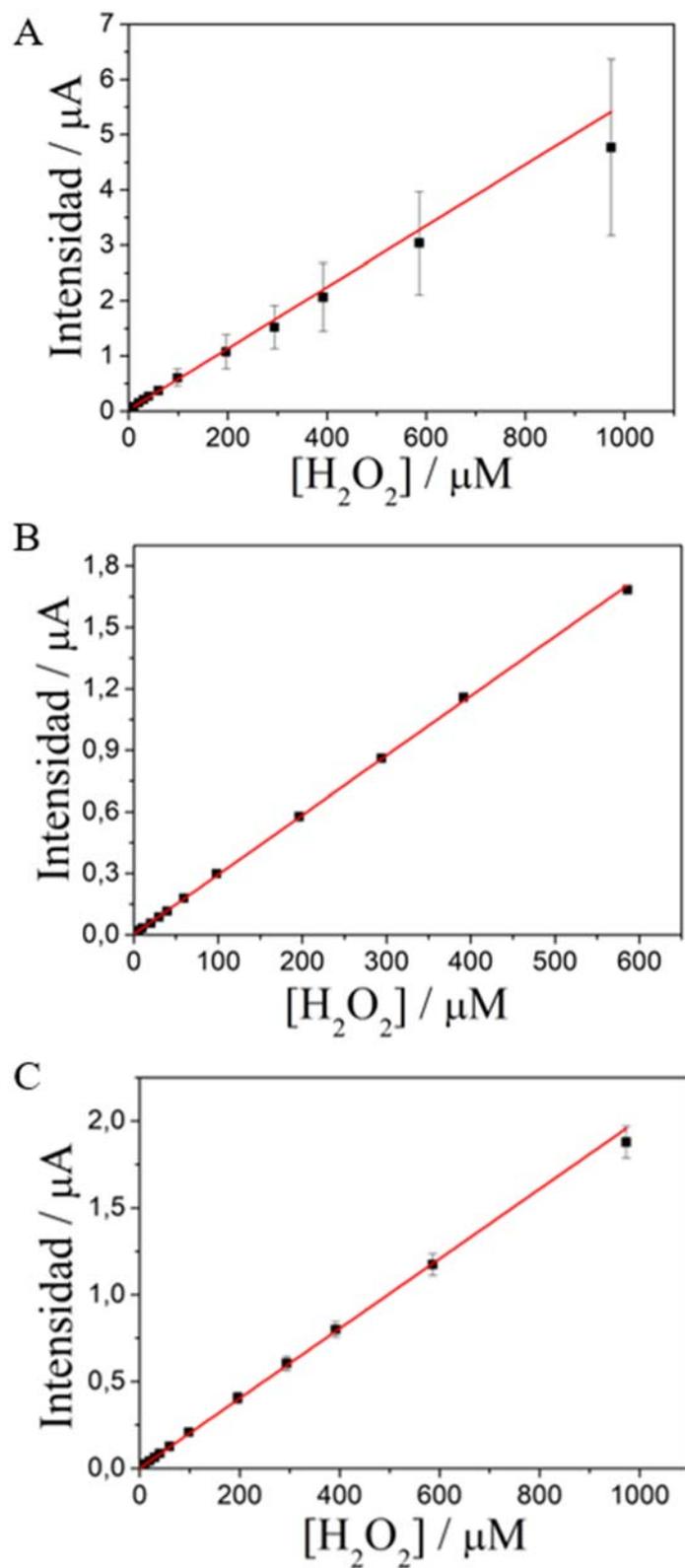
#### 6.1.4 Características electroanalíticas de los electrodos con nanomateriales funcionalizados con NPs metálicas e híbridas

Con el objetivo de evaluar la respuesta electroanalítica de los sensores desarrollados y su eficacia en la detección de  $H_2O_2$ , se realizaron calibrados con  $H_2O_2$  y se determinaron los parámetros de calibración de cada uno de los sensores frente al  $H_2O_2$ . Las medidas se llevaron a cabo mediante la técnica de amperometría hidrodinámica, a un potencial fijo de 600 mV (*vs* Ag/AgCl) y utilizando un medio tamponado con PBS 0,1M.

El potencial aplicado 600 mV se mantuvo constante en todos los calibrados para poder comparar la respuesta de los distintos electrodos. Los parámetros analíticos, como el intervalo lineal de respuesta, el límite de detección y la sensibilidad fueron evaluados para cada uno de los electrodos. En todos los casos las medidas se hicieron por triplicado y el límite de detección se calculó como, la mínima concentración experimentalmente detectable bajo las condiciones experimentales de trabajo.

En la Figura 6.8 se muestran los resultados obtenidos para el electrodo de 13 % de rGO y los electrodos nanocompuestos que contienen rGO funcionalizado con NPs metálicas de Au o de Pd. En la Tabla 6.3 se recogen los parámetros de calibración obtenidos.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la sensibilidad cuando se modifica los electrodos de grafeno con grafeno funcionalizado con NPs metálicas. En concreto, la sensibilidad para el electrodo de 2 % de Au-NP@rGO es un 47,3 % inferior a la del 13 % de rGO y la sensibilidad para el electrodo de 3% de Pd-NP@rGO es un 63,4 % inferior a la del 13 % de rGO. En contrapartida, el LD mejora significativamente, ya que para ambos electrodos disminuye aproximadamente, una década de concentración respecto al electrodo de 13 % de rGO. Mientras que el intervalo lineal de trabajo se mantiene constante. Los resultados obtenidos confirman que, a pesar de la disminución de sensibilidad observada, la incorporación de rGO funcionalizado con NPs metálicas en la matriz del nanocompuesto mejora la respuesta electroanalítica de los sensores. Adicionalmente, la reproducibilidad y la estabilidad de la señal medida se ve mejorada respecto al electrodo de rGO.



**Figura 6.8** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de  $H_2O_2$ . Electrodo de 13 % rGO (A), 2 % Au-NP@rGO + 12 % rGO (B) y 3 % Pd-NP@rGO + 11 % rGO (C). Potencial de trabajo: 600 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

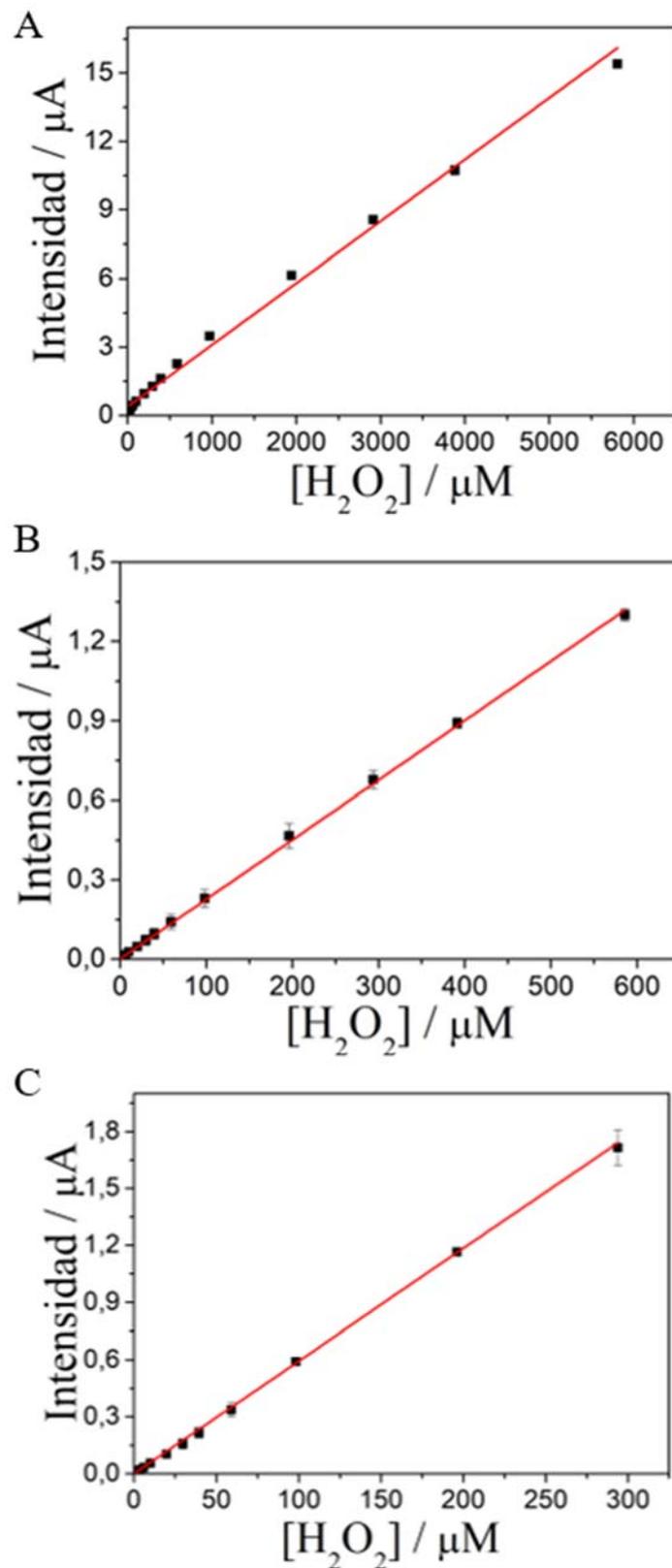
**Tabla 6.3** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con los electrodos nanocompuestos de rGO modificados con NPs metálicas. Electrodo de 13 % rGO, 2 % Au-NP@rGO + 12 % rGO y 3 % Pd-NP@rGO + 11 % rGO. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 600 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

Sensor	Intervalo lineal (μM)	Sensibilidad (μA·L·μM <sup>-1</sup> )	LD (μM)
13 %rGO	9-972	0,0055 ± 0,0002	10 ± 1
2 % Au-NP@rGO	1-585	0,00290 ±0,00001	1,2 ±0,2
3 % Pd-NP@rGO	1-972	0,00200 ±0,00002	1,2 ±0,3

En la Figura 6.9 se muestran los resultados obtenidos para los electrodos que incorporan NPs *bimetálicas* de Au/Pd en el electrodo nanocompuesto y mezcla de NPs de Au:Pd en proporción 2:3. En la Tabla 6.4 se recogen los parámetros de calibración obtenidos para estos electrodos.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la sensibilidad cuando se modifican los electrodos de grafeno con grafeno funcionalizado con NPs *bimetálicas*. Además, la sensibilidad incrementa ligeramente para el electrodo que contiene mezcla de NPs metálicas Au:Pd en una relación 2:3. En concreto, la sensibilidad para el electrodo de 3 % de 2Au/3Pd-NP@rGO es un 58,2 % inferior a la del 13 % de rGO (Tabla 6.3) y la sensibilidad para el electrodo de 3% de 1Au/2Pd-NP@rGO es un 50,9 % inferior a la del 13 % de rGO (Tabla 6.3). En cambio, la sensibilidad para el electrodo 3% (Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO) incrementa un 6,8 % respecto al electrodo de 13 % rGO. Posiblemente, porque este electrodo al prepararse con mezcla de Au-NP@rGO y Pd-NP@rGO presenta una mayor cantidad de rGO efectiva disponible en la matriz. Esta hipótesis estaría corroborada por el resultado obtenido en la caracterización electroquímica del mismo (Tabla 6.2), ya que presenta un área electroactiva similar a la del electrodo de 13 % rGO.

En contrapartida, el LD mejora significativamente, un orden de magnitud, para dos de los electrodos, en relación con el LD para el electrodo de 13 % rGO; mientras que para el electrodo de 3 % 1Au/2Pd-NP@rGO el LD empeora (20 μM), duplicando el valor obtenido para el electrodo de 13 % de rGO (10 μM) (Tabla 6.4).



**Figura 6.9** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de  $H_2O_2$ . Electrodo de 3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 11% rGO (A), 3% 1Au/2Pd-NP@rGO + 11% rGO (B) y 3% (Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO) + 11% rGO (C). Potencial de trabajo: 600 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

Respecto al intervalo lineal de trabajo se mantiene el mismo orden de magnitud, a excepción del electrodo que contiene 2Au:3Pd que reduce la concentración superior del intervalo lineal, a la mitad de los otros electrodos. Los resultados obtenidos confirman que, a pesar de la disminución de sensibilidad observada, para los electrodos que incorporan nanopartículas *bimetálicas*, la disminución de sensibilidad es equivalente a la obtenida para los electrodos modificados con NPs de solo un metal. Análogamente, al caso de la incorporación de rGO funcionalizado con NPs metálicas, se obtiene una mejora general de la respuesta analítica de los sensores; así como, de la reproducibilidad y la estabilidad de la señal medida respecto al electrodo de rGO.

Como conclusión de los resultados obtenidos, en la caracterización electroquímica y electroanalítica, y como prueba de concepto, se decide continuar el desarrollo de un (bio)sensor de glucosa utilizando rGO como material conductor base y el nanomaterial híbrido formado por NPs *bimetálicas* de 2Au/3Pd-NP@rGO como catalizador. Se selecciona este material porque asegura un LD lo suficientemente bajo y un intervalo dinámico de respuesta, y sensibilidad adecuadas para su aplicación.

**Tabla 6.4** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con los electrodos nanocompuestos de rGO modificados con NPs *bimetálicas*. Electrodos de 3 % 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO, 3 % 1Au/2Pd-NP@rGO + 11 % rGO. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 600 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

Sensor	Intervalo lineal (μM)	Sensibilidad (μA·L·μM <sup>-1</sup> )	LD (μM)
<b>3% 2Au/3Pd-NP@rGO</b>	1-585	0,0023 ± 0,0003	1,00±0,05
<b>3% 1Au/2Pd-NP@rGO</b>	20-508	0,0027 ± 0,0002	20,0 ± 0,3
<b>3% Au-NP@rGO plus Pd-NP@rGO (2:3)</b>	1-293	0,0059 ± 0,0002	1,02 ± 0,03

## 6.2 Biosensores basados en electrodos nanocompósitos de materiales híbridos y glucosa oxidasa

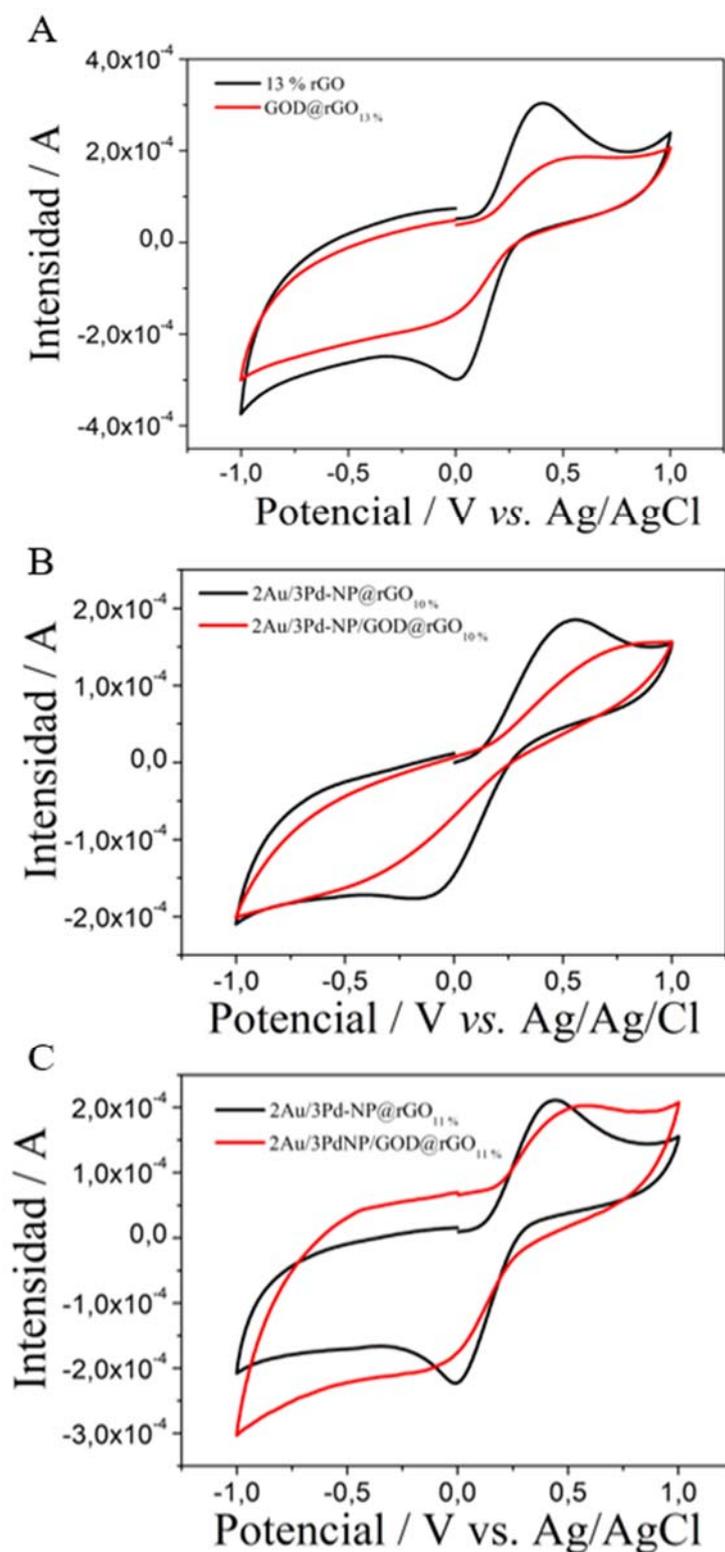
El objetivo de esta parte del trabajo es la construcción y caracterización electroquímica de biosensores desarrollados con nanomateriales híbridos de NPs *bimetálicas* y un enzima modelo o de referencia. En concreto se ha seleccionado la enzima glucosa oxidasa (GOD), debido a la experiencia del grupo de investigación en trabajos previos con esta enzima y su relativa accesibilidad económica.<sup>2,3</sup> Como se ha discutido en la sección anterior (§ 6.1.4), los electrodos nanocompósitos que mejoran la señal analítica (LD, sensibilidad e intervalo lineal de respuesta) y catalizan la oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un potencial menor ( $\approx 0,6$  V), son los que contienen 3% de 2Au/3Pd-NP@rGO en el nanocompósito. En esta sección se describen los resultados obtenidos en la construcción de biosensores que incorporan la enzima GOD en el material transductor nanocompósito híbrido.

Se han construido tres tipos distintos de biosensores que contienen GOD, con/sin NPs *bimetálicas*, de distinta composición de rGO, y se ha comparado su respuesta electroquímica con transductores nanocompósitos sin GOD. Los electrodos han sido preparados por parejas con/sin GOD para minimizar posibles diferencias en los nanomateriales de partida: rGO y nanomateriales híbridos (§ 3.4.1).

En concreto se han preparado y comparado la respuesta analítica de los tres tipos de biosensores siguientes: A) **13% rGO vs. 1% GOD + 13% rGO**; B) **3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 10 % rGO vs. 1% GOD + 3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 10 % rGO** y, C) **3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO vs. 1% GOD + 3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO**.

En la Figura 6.10 se muestran los voltamperogramas obtenidos para los tres tipos de biosensores construidos, agrupados por su similitud de composición; es decir, mismo material nanocompósito transductor, sin/con GOD. Los voltamperogramas cíclicos de los diferentes biosensores se han realizado con una compensación óhmica y con una disolución de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 0,01 M en KCl 0,1 M .

En la Tabla 6.5 se muestran los parámetros electroquímicos obtenidos de las CVs. En general, se observa que la introducción de la enzima en el material transductor produce una disminución del área electroactiva y un aumento notable de la separación ( $\Delta E$ ) entre los potenciales de picos de oxidación y reducción. Por otro lado, la R<sub>CT</sub> se comporta de forma distinta según los electrodos considerados.



**Figura 6.10** Voltamperogramas cíclicos obtenidos para los diferentes electrodos nanocompuestos construidos: 13 % rGO y GOD@rGO<sub>13%</sub> (A); 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>10%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub> (B); 2Au/3Pd@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub>. Se utilizó una disolución de KCl 0,1M con una concentración equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,01M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

Se observa un comportamiento diferenciado entre los nanocompósitos que no contienen NPs bimetalicas (rGO sin/con GOD) y los que sí las tienen (2Au/3Pd-NP@rGO sin/con GOD).

En la Figura 6.10 (A) se muestran las CVs de los electrodos preparados únicamente con rGO sin/con GOD. Como se puede observar la forma de la CV del electrodo nanocompósito que contiene GOD, GOD@rGO<sub>13%</sub>, muestra un comportamiento electroquímico menos reversible que la del electrodo 13 % rGO, incrementando la distancia entre los potenciales de pico y disminuyendo el valor de la  $I_p^c$ . Por otro lado, se observa un incremento significativo de la  $R_{CT}$  que incrementa en un 42,6 % respecto al electrodo de 13 % rGO, disminuye su área electroactiva en un 39,3 % e incrementa el valor de la  $R_{CT}$  normalizada por el área (Tabla 6.5). Estos resultados evidencian que la presencia de GOD en la matriz del nanocompósito produce un distanciamiento entre las partículas conductores del material, lo que conlleva una disminución del área electroactiva y el consecuente incremento de la  $R_{CT}$ .

**Tabla 6.5** Parámetros obtenidos de los voltamperogramas cíclicos de los electrodos nanocompósitos constuidos. Donde  $i_0$  es la intensidad de corriente de intercambio;  $R_{CT}$  es la resistencia a la transferencia de carga;  $I_p^c$  es la intensidad de pico reducción; A es el área electroactiva;  $\Delta E$  es la diferencia de potenciales de pico anódico y catódico, y  $R_{CT} \cdot A$  es la resistencia a la transferencia de carga normalizada respecto el área electroactiva.

% rGO	$i_0$ (A)	$R_{CT}$ ( $\Omega$ )	$I_p^c$ (A)	A (cm <sup>2</sup> )	$\Delta E$ (V)	$R_{CT} \cdot A$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
13 % rGO	1,10E-04	229	-2,99E-04	0,56	0,3953	128,50
GOD@rGO <sub>13%</sub>	6,31E-05	399	-1,80e-04	0,34	0,7225	135,67
2Au/3Pd- NP@rGO <sub>10%</sub>	3,85E-05	655	-1,76E-04	0,33	0,7441	216,15
2Au/3Pd- NP/GOD@rGO <sub>10%</sub>	2,65E-05	596	-1,72E-04	0,32	0,8226	190,72
2Au/3Pd- NP@rGO <sub>11%</sub>	6,12E-05	412	-2,23E-04	0,42	0,4552	173,04
2Au/3Pd- NP/GOD@rGO <sub>11%</sub>	7,82E-05	322	-2,07E-04	0,39	0,7519	125,58

En la Figura 6.10 (B, C) se muestran las CVs de los electrodos nanocompósitos que contienen NPs bimetalicas sin/con GOD y dos porcentajes distintos de rGO (10% y 11%).

Los resultados obtenidos muestran, como en el caso anterior, que la incorporación de la enzima modifica el comportamiento electroquímico del transductor haciendo que este tenga un comportamiento menos reversible. Produciéndose una mayor separación entre los potenciales de pico y una pequeña disminución en la  $I_p^c$ . Este comportamiento se evidencia más para el electrodo nanocompuesto con un 10 % rGO (Figura 6.10 (B)) respecto al electrodo nanocompuesto con un 11% rGO (Figura 6.10 (C)). En este último, se compensa la separación de las partículas conductores, provocada por la incorporación de la enzima, con el incremento de material conductor adicional, 1% de rGO. Esto hecho se evidencia también la disminución de  $\Delta E$  observada entre el pico de oxidación y reducción para este electrodo.

En referencia a los valores de  $R_{CT}$  y al área electroactiva de los electrodos que contienen NPs *bimetálicas*, estos presentan un comportamiento electroquímico distinto a los electrodos que únicamente contiene rGO. Si bien, los resultados obtenidos evidencian que la incorporación de la enzima incrementa la distancia entre partículas conductoras; es decir, entre láminas de grafeno, e incrementa la  $R_{CT}$  respecto a los electrodos 13 % rGO y GOD@rGO<sub>13%</sub>, la presencia de grafeno funcionalizado con NPs *bimetálicas* parece estabilizar la matriz del nanocompuesto. Este comportamiento se observa para ambos electrodos independientemente de la carga de grafeno (10 % rGO y 11 % rGO), en ambos casos se obtiene, comparativamente entre ellos, sólo una pequeña disminución del área electroactiva y una *sorprendente disminución* de la  $R_{CT}$  cuando se incorpora la enzima en la matriz del nanocompuesto.

El área electroactiva disminuye solo un 3% en los electrodos 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub> respecto al electrodo de igual composición sin GOD (Figura 6.9 (B)). Mientras que para el electrodo 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> la disminución observada es mayor, del 7, 1 %, respecto al electrodo de igual composición sin GOD (Figura 6.9 (C)). Se ha de destacar que, en ninguno de los dos casos, la variación del área electroactiva llega al 39, 3% de disminución que se da para el electrodo de GOD@rGO<sub>13%</sub> sin NPs *bimetálicas*. Estos valores están en concordancia con los valores obtenidos de *disminución* de la  $R_{CT}$  para ambos electrodos. En el primer caso, se reduce un 9 % la  $R_{CT}$  del electrodo 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub> respecto al electrodo de igual composición sin GOD. En el segundo caso, se reduce un 21,8 % la  $R_{CT}$  del electrodo 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> respecto al electrodo de igual composición sin GOD.

Los resultados obtenidos para los electrodos nanocompósitos de 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO (10 % y 11 %), permiten hipotetizar sobre la razón de la mejora de las propiedades electroquímicas del transductor nanocompósito desarrollado con materiales híbridos y GOD. Si se comparan entre sí los electrodos con igual porcentaje de rGO, se debe destacar la disminución de la resistencia a la transferencia de carga del electrodo con GOD respecto al electrodo sin GOD. Además, estos electrodos, para una misma composición de rGO, presenten un área electroactiva prácticamente constante entre ellos. Los resultados obtenidos parecen indicar que la incorporación de la enzima en un nanocompósito que contiene un material híbrido optimiza la distribución del nanomaterial en la matriz, estabilizando, separando y dispersando eficazmente las láminas de rGO funcionalizado con NPs *bimetálicas*. De esta manera se asegura el contacto eléctrico mínimo y suficiente entre las láminas conductoras, ya que la  $R_{CT}$  disminuye cuando está presente 1 % de GOD en el transductor nanocompósito. Este hecho se corroboraría con el diferente comportamiento observado cuando en el nanocompósito solo tiene rGO (Tabla 6.5) lo que provoca un incremento considerable de la  $R_{CT}$  (42,6 %) y una disminución importante del área electroactiva (39,3 %).

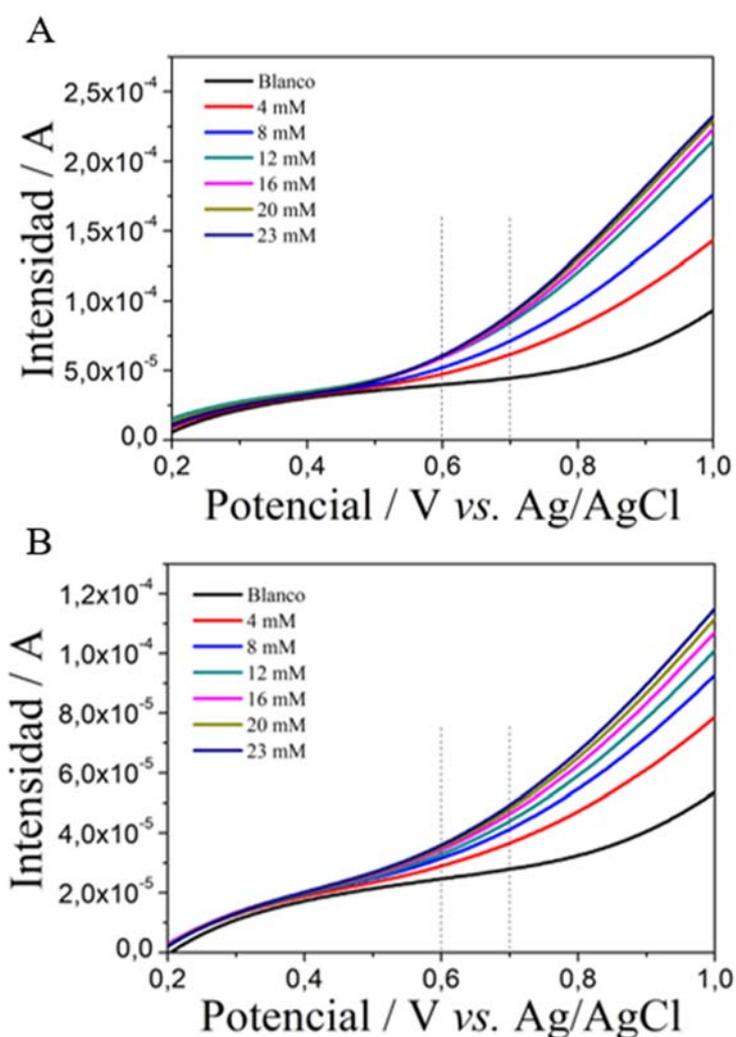
Los resultados obtenidos permiten concluir que los electrodos **1% GOD + 3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO**, son los que aportan las mejores características electroquímicas (poca modificación del área electroactiva y menor resistencia a la transferencia de carga con respecto a los electrodos 2Au/3Pd-NP@rGO) y serán los que se utilizarán para la aplicación analítica de determinación de glucosa.

### 6.2.1 Caracterización electroanalítica de los biosensores basados en nanocompósitos de materiales híbridos/glucosa oxidasa

Previo a la aplicación de los electrodos nanocompósitos modificados con GOD a la determinación de glucosa se caracterizaron electroanalíticamente. Primero, se evaluó el potencial de oxidación del  $H_2O_2$  con los electrodos de 13% rGO (con/sin GOD) y segundo, con los electrodos nanocompósitos modificados con partículas *bimetálicas* y GOD (**1% GOD + 3% 2Au/3Pd-NP@rGO + 11 % rGO**).

En la Figura 6.11 se pueden observar los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para los electrodos que no contienen NPs *bimetálicas* y solo contienen rGO: sin GOD

(Figura 6.11 (A)) y con GOD (Figura 6.11 (B)). Se puede observar que la incorporación de la enzima no tiene ningún efecto significativo en el potencial de oxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que sigue estando en torno a los 0,6 V igual que para los electrodos nanocompuestos sin GOD (§ 6.1.3); únicamente se puede observar una disminución no significativa de la intensidad de corriente, cuando se incorpora la GOD en el nanocompuesto. Esta disminución está relacionada directamente con la disminución del área electroactiva del electrodo GOD@rGO respecto al de 13 % rGO, discutida en la sección 6.2.



**Figura 6.11** Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Electrodo: 13 % rGO (A); GOD@rGO<sub>13%</sub> (B). Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

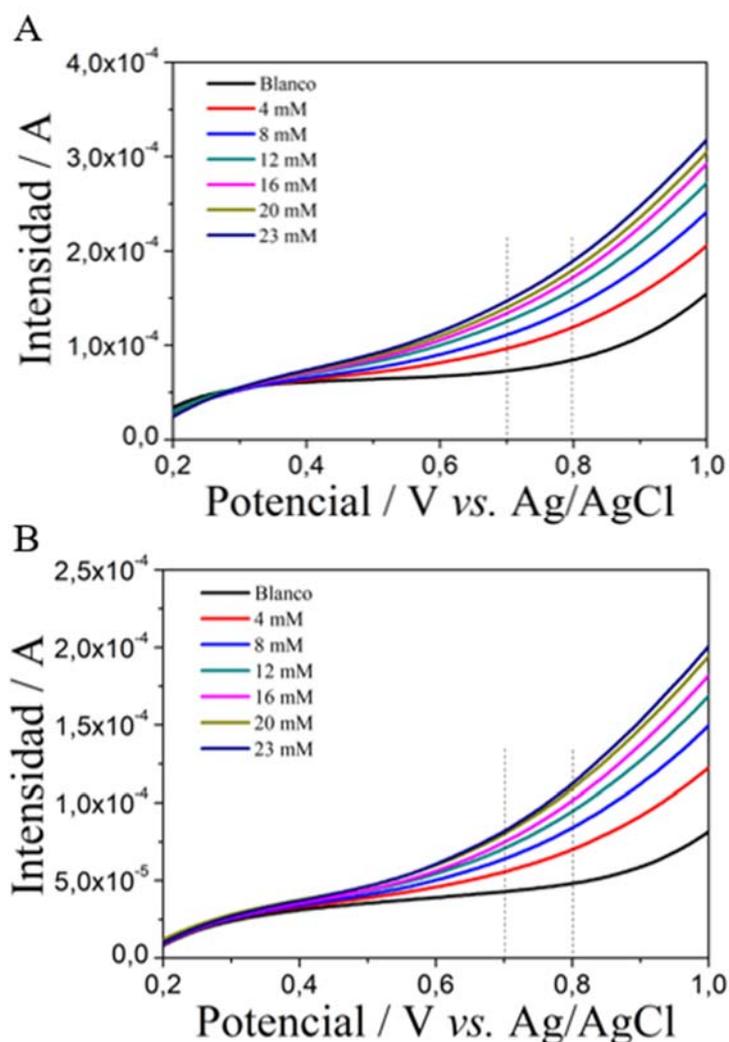
Se ha de destacar que, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del biosensor de glucosa, se fijará el potencial de oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para estos electrodos en 0,7 V, ya que se obtienen una mayor diferenciación de intensidad a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin que el agua llegue a oxidarse significativamente.

En la Figura 6.12 se pueden observar los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para los electrodos que contienen 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub>: sin GOD (Figura 6.12 (A)) y con GOD (Figura 6.12 (B)). Se puede observar que la incorporación de la enzima no tiene ningún efecto significativo en el potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que sigue estando en torno a los 0,6 V, igual que para los electrodos nanocompósitos con NPs bimetalicas sin GOD (§ 6.1.3). Aunque también se evidencia una pequeña disminución del potencial de oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para el electrodo que contiene GOD.

Comparativamente a los electrodos de rGO, se puede observar un incremento no significativo de la intensidad de corriente, cuando se incorpora la enzima GOD en el nanocompósito (Figura 6.12 (B)). Este incremento parece estar relacionado con las pequeñas diferencias observadas en el área electroactiva entre los dos electrodos, de tan solo un 7,1 % inferior en el caso que contiene GOD. Por otro lado, el incremento en la intensidad de corriente puede estar relacionado con las mejores propiedades electroquímicas del electrodo nanocompósito que contiene GOD.

Como se puede comprobar en la Tabla 6.5, este electrodo presenta la mejor R<sub>CT</sub>·A (125,58 Ω·cm<sup>2</sup>) de todos los transductores nanocompósitos estudiados, siendo del mismo orden de magnitud que la del electrodo de 13 % rGO (128,50 Ω·cm<sup>2</sup>). Se ha de destacar que, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del biosensor de glucosa, se fijará el potencial de oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estos electrodos en 0,7 V; ya que, al igual que para los electrodos de rGO, se obtiene una mayor diferenciación de intensidad a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se ha de destacar que se mantienen los resultados obtenidos en la comparación de la respuesta del electrodo de 15% de grafito respecto al 13% rGO (§ 6.1.3). En este caso el potencial aplicado en el electrodo 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> se reduce 200-300 mV respecto al biosensor de grafito (1% GOD – 17% grafito) estudiado en trabajos previos, donde el potencial de trabajo se situaba en torno a los 1000 mV.<sup>3</sup> Esta disminución tiene como efecto neto el incremento de la selectividad al disminuir el potencial de trabajo, observándose además, una separación significativa del potencial de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al agua.

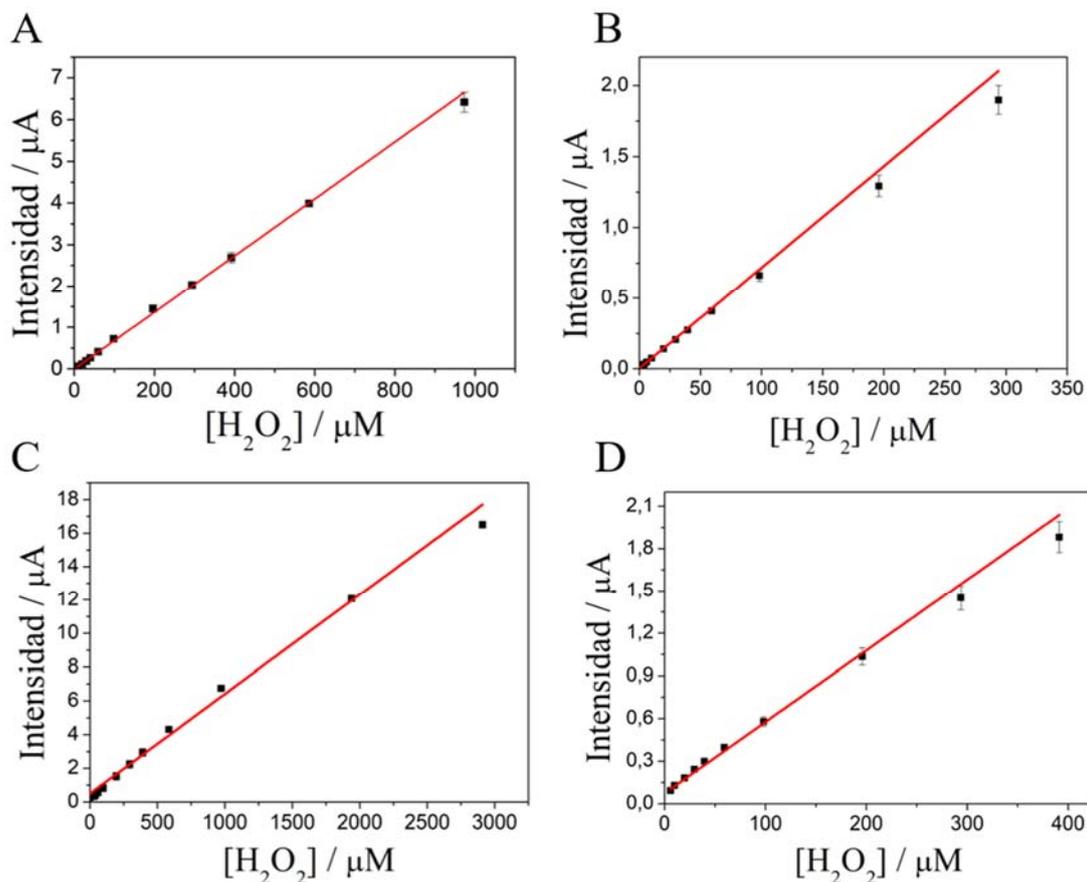


**Figura 6.12** Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Electrodo: 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub> (A), 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (B). Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. Velocidad de barrido 10 mV/s.

### 6.2.2 Caracterización electroanalítica y evaluación de la respuesta analítica de los (bio)sensores

En este apartado se describen los resultados obtenidos de la caracterización electroanalítica de los (bio)sensores desarrollados. Se ha comparado la respuesta analítica de los electrodos con rGO sin/con GOD y, posteriormente, se compara la respuesta analítica de los dos electrodos construidos a partir de NPs *bimetálicas*, 2Au/3PdNP@rGO, con y sin la enzima GOD. Se han realizado calibrados comparativos para los 4 electrodos y se han evaluado los parámetros de calidad de estos. Los calibrados han sido realizados en un medio de tampón PBS 0,1M en fondo iónico de KCl 0,1 M y el

potencial de trabajo aplicado ha sido 700 mV (vs. Ag/AgCl). Se han realizado tres calibrados sucesivos para cada electrodo, para poder estimar la incertidumbre experimental. El límite de detección se ha determinado experimentalmente como la primera concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con señal diferenciable del blanco.



**Figura 6.12** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Electrodo de 13 % rGO (A), 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub> (B), GOD@rGO<sub>13%</sub> (C) y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (D). Potencial de trabajo: 700 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

En la Tabla 6.6 se recogen los resultados obtenidos: intervalo lineal de respuesta, sensibilidad y límite de detección. Se puede observar como la incorporación del enzima GOD, en los electrodos nanocompósitos, disminuye notablemente los límites de detección para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Paralelamente, la sensibilidad también disminuye tres órdenes de magnitud. Si se compara la respuesta de los electrodos modificados con NPs entre sí (Figura 6.12 (B) y (D)), no se observan grandes diferencias en los parámetros electroanalíticos obtenidos. Aunque la señal obtenida mejora respecto a los electrodos sin NPs, obteniéndose menores intensidades de corriente, pero también menos ruido en la

medida. Este hecho se corrobora con la disminución del LD obtenida para los electrodos con NPs *bimetálicas*.

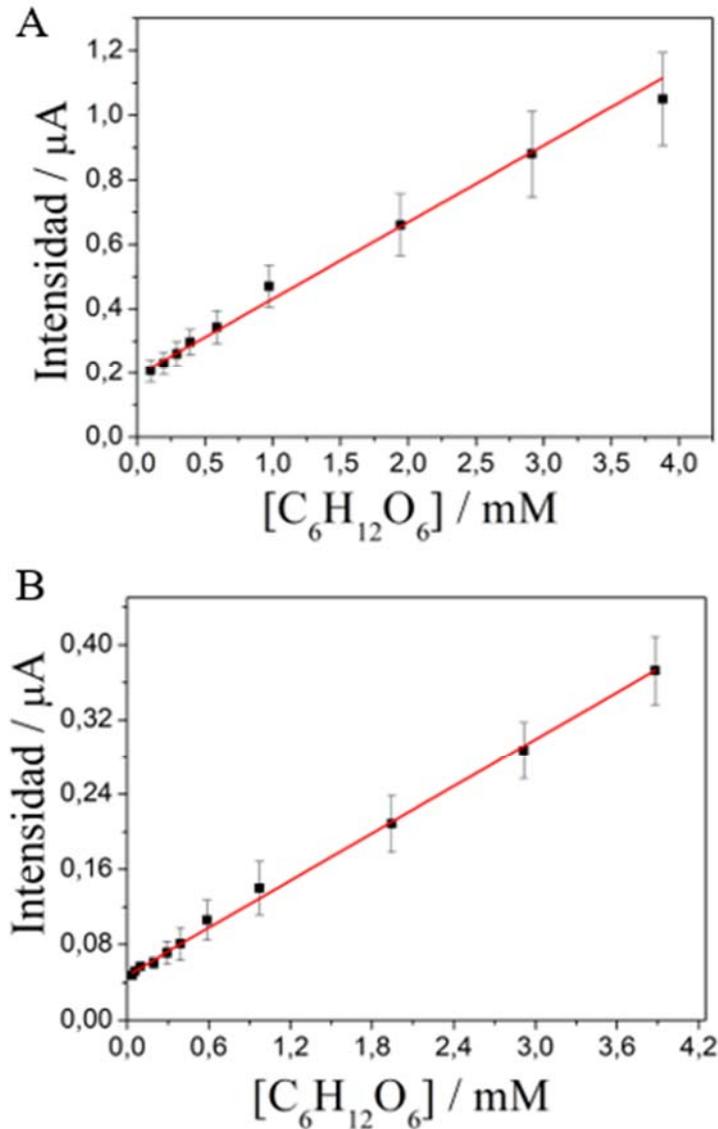
**Tabla 6.6** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Electrodo de 13 % rGO, GOD@rGO<sub>13%</sub>, 2Au/3Pd-NPs@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP/s-GOD@rGO<sub>11%</sub>. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 700 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

Sensor	Intervalo lineal (μM)	Sensibilidad (μA·L·μM <sup>-1</sup> )	LD (μM)
13 % rGO	6-972	0,00684±0,00006	6
GOD@rGO <sub>13%</sub>	19-2912	0,0059 ±0,0001	19
2Au/3Pd-NP@rGO <sub>11%</sub>	1-293	0,0071±0,0001	1
2Au/3Pd-NP/GOD@rGO <sub>11%</sub>	6-391	0,0050±0,0001	6

Una vez caracterizados electroanalíticamente los (bio)sensores, mediante la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se aplicaron en la detección de glucosa. En la Tabla 6.7 se detallan los parámetros de calibración obtenidos para los dos biosensores: GOD@rGO<sub>13%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub>. Los calibrados han sido realizados en un medio de tampón PBS 0,1M en fondo iónico de KCl 0,1 M y el potencial de trabajo aplicado ha sido 700 mV (*vs.* Ag/AgCl). Se han realizado tres calibrados sucesivos para cada electrodo, para poder estimar la incertidumbre experimental. El límite de detección se ha determinado experimentalmente como la primera concentración de glucosa con señal diferenciable del blanco. En la Figura 6.13 podemos apreciar las curvas de calibración de glucosa obtenidas para los dos biosensores. Se puede observar que la sensibilidad del biosensor que contiene NPs *bimetálicas* es significativamente inferior al biosensor de GOD@rGO<sub>13%</sub>. Por otro lado, como ocurría en el caso anterior, el biosensor con NPs *bimetálicas* parece tener señales más pequeñas, pero con menos ruido, como se deduce de la incertidumbre (estimada como la desviación estándar) que presentan las medidas.

En la Tabla 6.7 se recogen los resultados obtenidos: intervalo lineal de respuesta, sensibilidad y límite de detección. Se puede observar como la sensibilidad disminuye un orden de magnitud para el biosensor con NPs *bimetálicas*. Se ha de destacar que la señal obtenida mejora respecto al electrodo sin NPs, obteniéndose intensidades de corriente

menores, pero también menos ruido en la medida. Este hecho se corrobora también con la mejora del LD obtenido para el electrodo con NPs *bimetálicas* (0,04  $\mu\text{M}$ ) respecto a GOD@rGO<sub>13%</sub> (0,09  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 6.13** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de glucosa. Electrodo de GOD@rGO<sub>13%</sub> (A) y 2Au/3PdNP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (B). Potencial de trabajo: 700 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

**Tabla 6.7** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de glucosa. Electrodo GOD@rGO<sub>13%</sub> y 2Au/3PdNP/GOD@rGO<sub>11%</sub>. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 700 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

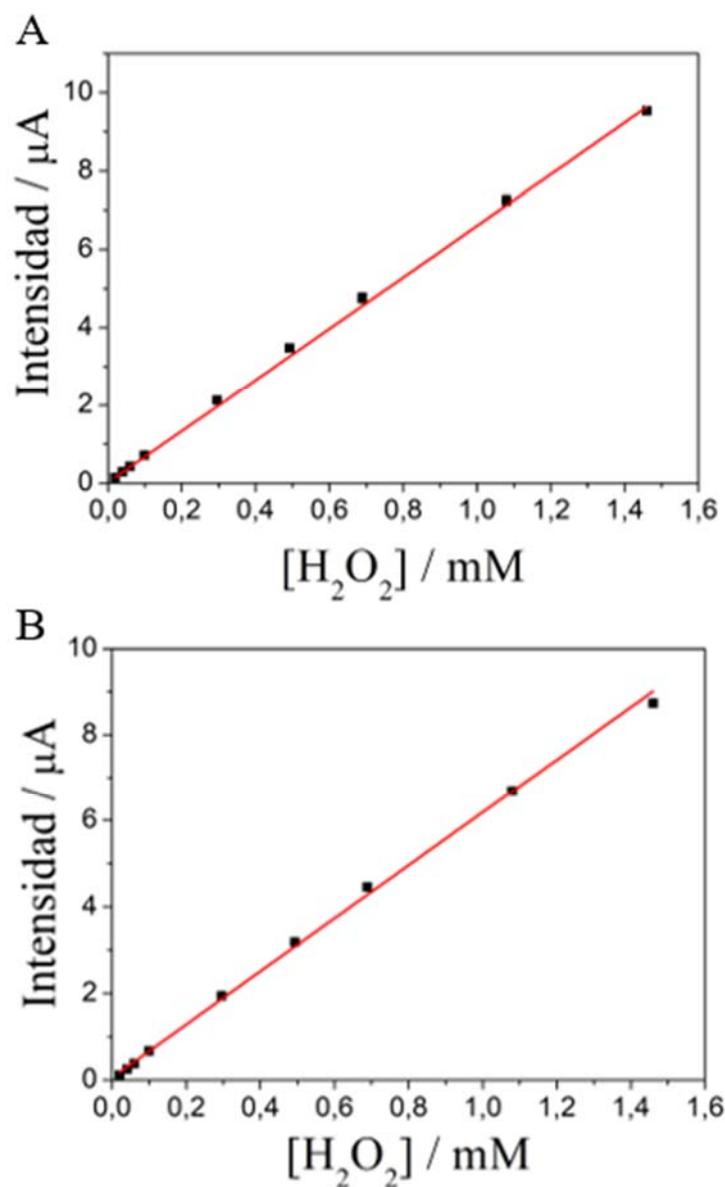
Sensor	Intervalo lineal (μM)	Sensibilidad (μA·L·μM <sup>-1</sup> )	LD (μM)
GOD@rGO <sub>13%</sub>	0,09-4	0,24±0,01	0,09
2Au/3Pd-NP/ GOD@rGO <sub>11%</sub>	0,04-4	0,084±0,002	0,04

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad obtenida con el sensor 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> se estudió la variación de la respuesta electroanalítica al incrementar 100 mV el potencial de trabajo. Los resultados obtenidos en el estudio de potencial de trabajo (Figura 6.12), permitieron definir el potencial de trabajo de 0,7 V; pero también se observa que a potenciales mayores las ondas anódicas se separen más entre sí y que la intensidad incrementa. En concreto, se realizaron calibrados comparativos entre los sensores con partículas *bimetálicas* sin/con GOD, para evaluar su respuesta frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un potencial de 0,8 V.

En la Figura 6.14 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para ambos (bio)sensores. En la Tabla 6.8 se muestran los parámetros de calibración obtenidos para ambos electrodos (sin/con GOD). Se puede observar que los parámetros de calibración obtenidos para el sensor y el biosensor son idénticos, únicamente difieren entre sí, por una mínima diferencia, las sensibilidades obtenidas. Aunque la diferencia es muy pequeña, se aprecia que el sensor con GOD tiene una sensibilidad ligeramente inferior. Este hecho se explica por reducción del área electroactiva que provoca la incorporación de 1% de GOD en la matriz del nanocompuesto (ver tabla 6.5). Se puede comprobar que la sensibilidad del biosensor incrementa dos órdenes de magnitud (98,6 %) respecto a un potencial de trabajo de 0,7 V (Tabla 6.7).

Finalmente, con el objetivo de definir el biosensor con mejores características de respuesta: sensibilidad y LD, se comparó los dos biosensores construidos con distintas cantidades de rGO sin funcionalizar y la misma cantidad de rGO funcionalizado con NPs *bimetálicas* (3 % de 2Au3PdNPs@rGO) y GOD (1 %). Como ya se ha explicado

anteriormente (§ 6.2), su composición solo difiere en el porcentaje de rGO en el material transductor nanocompósito: 10 % y 11 %.



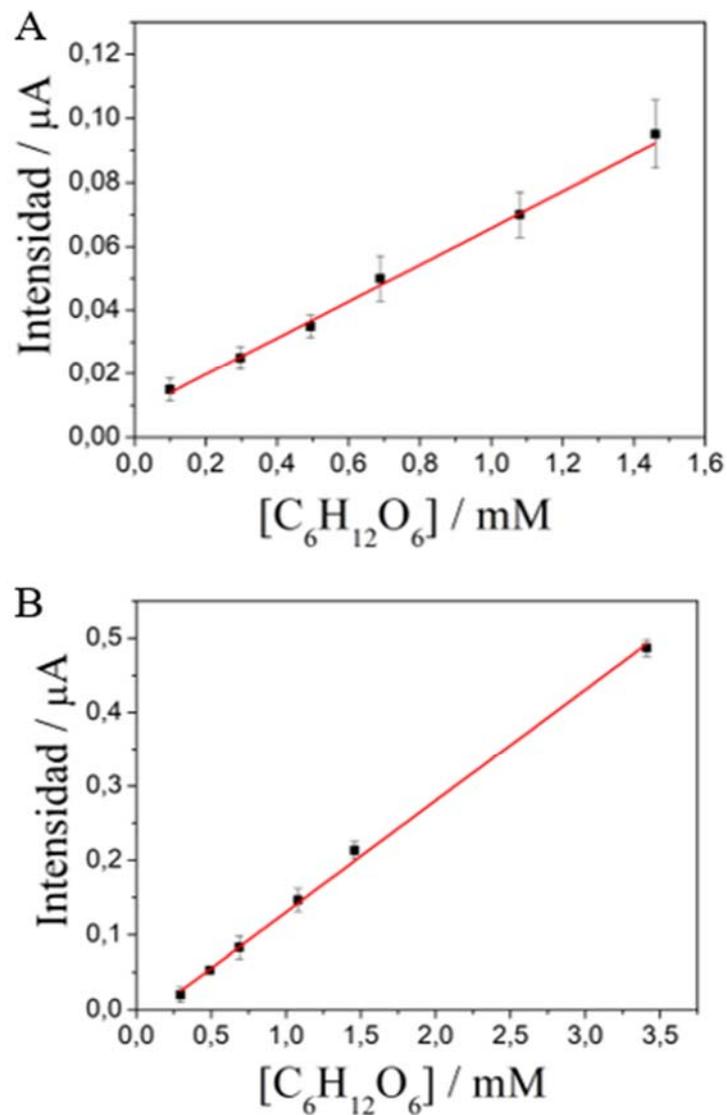
**Figura 6.14** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Electrodo: 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub> (A) y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (B). Potencial de trabajo: 800 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

**Tabla 6.8** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Electrodo 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub>. Medidas efectuadas en una disolución 0,1 M PBS con fondo iónico de KCl 0,1 M. El potencial de trabajo es 800 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

<b>Sensor</b>	<b>Intervalo lineal (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{A}\cdot\text{L}\cdot\text{mM}^{-1}</math>)</b>	<b>LD (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub></b>	0,02-2	6,59±0,06	0,02
<b>2Au/3Pd-NP/- GOD@rGO<sub>11%</sub></b>	0,02-2	6,13±0,09	0,02

En la Tabla 6.9 se muestran los parámetros de calibración obtenidos, utilizando como analito glucosa, a un potencial de trabajo de 800 mV. Se puede apreciar como la sensibilidad aumenta un 68% cuando se incrementa la carga de material conductor, mientras que el límite de detección empeora ligeramente incrementando su valor. En la Figura 6.15 se muestran las dos curvas de calibración obtenidas para los dos biosensores. Se aprecia una respuesta mayor para el electrodo con 11% rGO (Figura 6.15 (B)). Aunque aparentemente la incertidumbre experimental es más pequeña para este biosensor, el LD incrementa significativamente (Tabla 6.9) aunque sigue siendo del mismo orden de magnitud.

Los resultados obtenidos corroboran la información previa obtenida en la caracterización de los transductores nanocompuestos (Tabla 6.5). Donde el área electroactiva incrementa al incrementar en 1 % el porcentaje de rGO en el nanocompuesto; simultáneamente, a la mejora de la resistencia a la transferencia de carga normalizada ( $R_{CT}\cdot A$ ). En este caso, las mejores características electroquímicas las alcanza el biosensor con mayor carga de rGO (11 %). Por tanto, estas propiedades se traducen en una mejora de las propiedades electroanalíticas del sensor, con una sensibilidad, LD e intervalo lineal de respuesta, potencialmente muy significativas.



**Figura 6.15** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de glucosa. Electrodo: 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub> (A) y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (B). Potencial de trabajo: 800 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

**Tabla 6.9** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de glucosa. Electrodo 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>10%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 800 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

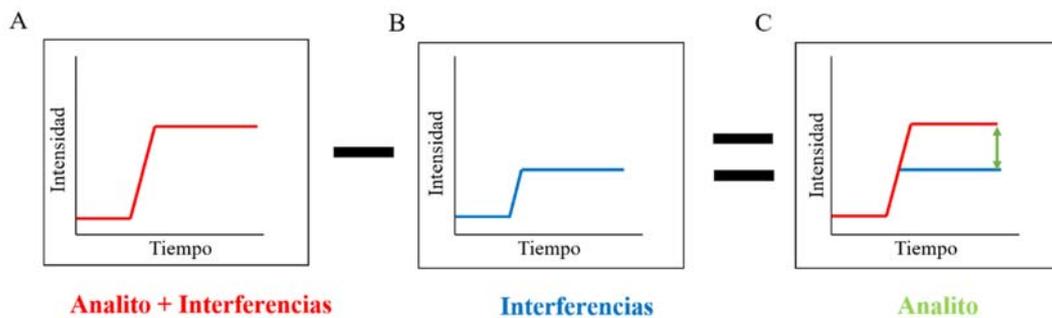
Sensor	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}\cdot\text{L}\cdot\text{mM}^{-1}$ )	LD (mM)
2Au3PdNP/GOD@rGO <sub>10%</sub>	0,1-1,5	0,057±0,002	0,1
2Au3PdNP/GOD@rGO <sub>11%</sub>	0,3-3	0,150±0,003	0,3

### 6.2.3 Estudio preliminar de la adaptación de composición del (bio)compósito nanoestructurado al uso de medidas diferenciales

Uno de los inconvenientes de utilizar métodos electroquímicos dinámicos, en concreto la técnica amperométrica, es su limitada selectividad. La amperometría hidrodinámica se basa en la aplicación de un potencial que produce la reacción de oxidación o de reducción del analito en la superficie del electrodo de trabajo. En la técnica amperométrica, tratada en detalle en la sección 1.2, se relaciona la intensidad de corriente asociada a este proceso redox con la concentración del analito. El principal inconveniente de esta técnica es su limitada selectividad ya que, para un determinado potencial requerido para producir el proceso redox del analito, cualquier otra especie presente en la muestra puede ser oxidada o reducida simultáneamente en la superficie del electrodo. Esto sucede cuando el potencial de oxidación o reducción requerido, para llevar a cabo el proceso redox de la especie interferente, es un potencial inferior al necesario para el oxidar o reducir al analito.

En el caso del biosensor de glucosa, podría ser oxidada cualquier especie presente en la muestra que necesite un potencial de oxidación menor a 800 mV; ya que este es el potencial utilizado para oxidar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en la reacción enzimática de oxidación de glucosa con GOD. De manera que toda especie electroactiva presente en la muestra, susceptible de ser oxidada a un potencial menor de 800 mV, será una interferencia. Esto dificulta enormemente las medidas amperométricas cuando hay interferencias y hace imprescindible un tratamiento previo de la muestra, para eliminar todas las especies que pueden ser oxidadas junto con el analito durante el análisis.

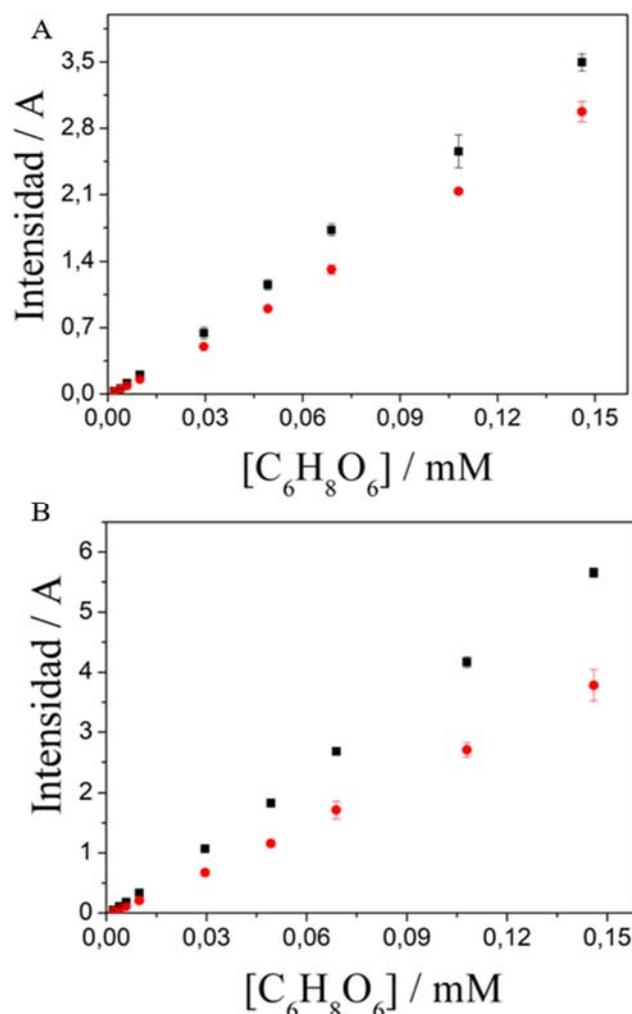
Con el objetivo de que la señal analítica medida corresponda solo al analito, y que no se vea afectada por la presencia de otras especies oxidables, se plantea por *primera vez* la utilización de medidas diferenciales. El uso de medidas diferenciales permite eliminar de la señal medida, la componente propia de las interferencias, quedando la señal útil o analítica. Es decir, realizar una “resta” de intensidades obtenidas de un biosensor (con enzima) que responde al analito y a las interferencias y de un electrodo no selectivo o sensor (sin enzima) que solo responde a las interferencias (Figura 6.16). La idea es construir un sensor y un biosensor que tengan las mismas propiedades electroquímicas y que respondan de la misma manera al interferente de referencia. En una primera aproximación, se construyeron dos electrodos nanocompósitos iguales, con la única diferencia que uno contenía enzima en el material transductor y otro no.



**Figura 6.16** Esquema representativo de las medidas diferenciales, donde (A) corresponde a la señal del biosensor, (B) corresponde a la señal registrada por el transductor y (C) es la diferencia entre señales biosensor/transductor, dando lugar a la intensidad generada por el analito.

Por tanto, la estrategia consiste en hacer dos medidas consecutivas con dos electrodos nanocompósitos de igual composición con/sin enzima. Estas dos medidas permiten restar la intensidad de corriente por la especie *interferente*, medida por el sensor  $I_1$ , a la intensidad de corriente medida por el biosensor *analito plus interferente* ( $I_2$ ). Es decir, la señal del sensor ( $I_1$ ) y la señal del biosensor ( $I_2$ ), donde  $I_2 > I_1$  y obtener la señal analítica correspondiente al analito como,  $I_{\text{analito}} = I_2 - I_1$ .

Con este objetivo, se ha estudiado la viabilidad de las medidas diferenciales utilizando como interferencia el ácido ascórbico y dos electrodos con NPs *bimetálicas* caracterizados y aplicados en este capítulo (Figura 6.17).



**Figura 6.17** Curvas de calibrado obtenidas mediante amperometría hidrodinámica en la detección de ácido ascórbico. Electrodo 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>10%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (A), y electrodo 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> (B). Potencial aplicado: 450 mV. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M (n=3, el error experimental es la desviación estándar).

En la Tabla 6.10 se muestran los parámetros de calibración obtenidos para dos sensores con distinta composición de rGO: 10 % y 11 %, y el biosensor: 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub>. Se puede comprobar que el electrodo nanocompuesto 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>10%</sub> y el biosensor 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> tienen exactamente la misma sensibilidad, así como el mismo LD. Mientras que el sensor con 1 % más de rGO (2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub>) tiene una sensibilidad superior al sensor 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>10%</sub>, lo que permite establecer que el sensor que tiene las características de respuesta electroanalíticas comparables al biosensor, es el que tiene menos carga de rGO (10 %). Este resultado permite concluir que, para que los transductores nanocompuestos con/sin

enzima tengan un comportamiento electroanalítico equivalente, se ha de compensar la disminución del área electroactiva, asociada a la incorporación del enzima en el biosensor debido la de separación de cargas conductoras que provoca, con una menor carga de material conductor en el transductor nanocompósito que actúa como sensor. Este resultado corrobora los obtenidos antes (Tabla 6.5).

**Tabla 6.10** Parámetros analíticos obtenidos mediante amperometría hidrodinámica para la detección de ácido ascórbico. Electrodo de 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>11%</sub>, 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> y 2Au/3Pd-NP@rGO<sub>10%</sub>. Medidas efectuadas en una disolución 0,1M PBS con fondo iónico de KCl 0,1M. El potencial de trabajo es 450 mV. Donde n=3, para el cálculo de la sensibilidad y del límite de detección. La incertidumbre experimental se ha estimado como la desviación estándar.

Sensor	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ( $\mu\text{A}\cdot\text{L}\cdot\text{mM}^{-1}$ )	LD (mM)
2Au/3Pd-NP@rGO <sub>11%</sub>	0,002-0,15	38,0±0,4	0,002
2Au/3Pd-NP/GOD@rGO <sub>11%</sub>	0,002-0,15	24,8±0,4	0,002
2Au/3Pd-NP@rGO <sub>10%</sub>	0,002-0,15	24,1±0,3	0,002

Si bien los resultados obtenidos permiten verificar el mismo comportamiento de sensor y biosensor frente al ácido ascórbico a un potencial aplicado de 450 mV, el potencial de trabajo que es necesario aplicar para oxidar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es 800 mV. La sensibilidad de ambos sensores respecto al ácido ascórbico incrementa mucho respecto a la sensibilidad de los mismos frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Principalmente, porque el intervalo lineal de respuesta para el ácido ascórbico es mucho mayor que para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta manera, el objetivo final de que ambos sensores respondan electroanalíticamente igual frente a la especie interferente ha sido alcanzado. Siendo la condición imprescindible para aplicar este tipo de estrategia que  $I_2 \gg I_1$  para restar posteriormente las dos intensidades, y poder obtener la intensidad correspondiente al analito.

Se ha de resaltar que el desarrollo de transductores nanocompósitos basados en NPs bimetalicas para el desarrollo futuro de (bio)sensores basados en nanocompósitos de rGO/epoxi aplicados a medidas diferenciales ofrece la posibilidad de variar y controlar la sensibilidad y límites de detección de los (bio)sensores desarrollados. Pero sería necesario un estudio más exhaustivo de los electrodos nanocompósitos para facilitar la medida diferencial, donde los potenciales de trabajo y la relación de concentraciones entre

interferente/analito lo permita, para asegurar que se mantiene  $I_2$  (*analito plus interferente*)  $\gg I_1$  (*interferente*).

### 6.3 Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas de esta parte del trabajo experimental son las siguientes:

- No se ha observado un efecto catalítico en los electrodos nanocompuestos que contienen NPs metálicas de Ag. Las NPs de Ag se oxidan a un potencial de oxidación muy bajo ( $\approx 190$  mV) lo cual impide el uso de este material nanocompuesto para la construcción de electrodos transductores nanocompuestos y su posterior aplicación como (bio)sensores.
- Se han construido transductores electroquímicos a partir de rGO modificado con NPs metálicas de diferentes tipos Au, Pd y NPs *bimetálicas* de Au/Pd. Estos transductores nanocompuestos han sido caracterizados electroquímicamente y evaluados mediante amperometría hidrodinámica. Se ha conseguido disminuir significativamente, a 800 mV, el potencial de oxidación del  $H_2O_2$ . En concreto, se ha reducido este potencial de oxidación 200 mV, respecto a otros sensores desarrollados anteriormente en el grupo de investigación, como el sensor de 15 % de grafito, cuyo potencial de oxidación es 1000 mV. En general, se ha observado una mejora de la respuesta analítica y una mejor estabilización de la señal analítica, en todos los transductores que incorporan NPs en el nanocompuesto, independientemente del tipo de NP metálica.
- Se han construido biosensores de GOD, utilizando como material conductor rGO y 2Au/3Pd-NP@rGO. Se han estudiado distintas composiciones de nanocompuestos variando la cantidad de material conductor (rGO), el tipo de NPs bimetálica (1Au/2Pd; 2Au/3Pd) y la cantidad de grafeno funcionalizado (Au/Pd-NP@rGO) en el transductor nanocompuesto. Las propiedades electroquímicas óptimas se han obtenido para el biosensor 2Au/3Pd-NPs/GOD@rGO<sub>11%</sub> de

composición: 1% GOD + 3% 2Au/Pd-NPs@rGO + 11 % rGO. Este biosensor ha presentado unas óptimas propiedades electroanalíticas de respuesta frente a glucosa.

- Se ha evaluado la viabilidad del uso de medidas diferenciales en la técnica de amperométrica hidrodinámica. Se utilizó el ácido ascórbico como interferencia analítica en la determinación de glucosa. Se ha podido concluir que el uso de medidas diferenciales, para eliminar las interferencias presentes en la muestra, es viable, siempre y cuando, se tenga una pareja de transductor/biosensor que responda electroquímicamente (potencial de trabajo) y electroanalíticamente (intensidad de corriente, sensibilidad y límite de detección) igual a la interferencia que al analito que se está analizando. Ya que es imprescindible que la relación entre las intensidades medidas por el sensor (*interferencia*) y el biosensor (interferente más analito) se mantenga siempre en una relación de valores:  $I_2 > I_1$ .

## 6.4 Bibliografía

- (1) Montes, R.; Bartrolí, J.; Céspedes, F.; Baeza, M. Towards to the Improvement of the Analytical Response in Voltammetric Sensors Based on Rigid Composites. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *733*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.09.022>.
- (2) Doctoral, T. Rosa Maria Olive-Monllau. Estratègies per a la caracterització i l'optimització de sensors voltamperomètrics basats en nous materials micro/nano estructurats. Integració en sistemes automàtics d'anàlisi. **2011**.
- (3) Doctoral, T. Raquel Montes Martínez. Caracterización de (bio)compósitos en función de la proporción de grafito y optimización de la composición para su aplicación en el desarrollo de (bio)sensores amperométricos. **2014**.



# Capítulo 7

## Conclusiones

---



## CAPÍTULO 7

### Conclusiones generales

El desarrollo de nuevos (bio)sensores basados en materiales carbonáceos, como grafito, nanotubos de carbono y grafeno, ha experimentado un gran avance durante los últimos años debido a las ventajas que ofrecen estos materiales. No obstante, la caracterización de los componentes individuales que forman los nanocompuestos ha quedado en un segundo plano.

Durante la realización de esta Tesis doctoral se han abordado una serie de objetivos que fundamentalmente, pretenden definir nuevos procedimientos sintéticos; así como, la implementación de protocolos de caracterización con el objetivo de desarrollar nuevos materiales nanocompuestos para la construcción de (bio)sensores amperométricos con propiedades óptimas desde el punto de vista analítico. Este estudio se ha definido en base a las similitudes de las propiedades electroquímicas que comparten los nanocompuestos con un haz de microelectrodos y las ventajas que estos aportan en referencia a la relación señal/ruido.

Asumiendo este comportamiento, se ha estudiado la calidad analítica y la reproducibilidad de la respuesta de los (bio)sensores amperométricos nanocompuestos basados en óxido de grafeno reducido desarrollados. En Tesis doctoral se ha sintetizado óxido de grafeno reducido utilizando diferentes tipos de grafito comercial como material conductor, para posteriormente ser integrado en transductores electroquímicos. Esto ha permitido concluir, la importancia que tiene la estructura y morfología del grafito de partida en el rGO resultante, el cual influye en gran medida en las propiedades electroquímicas y electroanalíticas de los transductores nanocompuestos desarrollados.

La composición del transductor, así como, el tipo de rGO utilizado es decisivo para obtener un transductor con la mejor respuesta analítica. Otro de los objetivos marcados en este trabajo, ha sido la incorporación de NPs metálicas en el material transductor con el propósito de mejorar las propiedades analíticas del (bio)sensor final. La cantidad y composición de estas NPs en la matriz del nanocompuesto, mejora significativamente la respuesta electroanalítica de los electrodos desarrollados gracias al efecto catalítico que introducen las NPs metálicas disminuyendo, además, el potencial de trabajo en la determinación de un analito.

Finalmente, las estrategias de caracterización han sido implementadas en la construcción de un biosensor de glucosa utilizando glucosa oxidasa (GOD), y se ha estudiado el efecto de los biomateriales compuestos nanoestructurados sobre las características de respuesta del biosensor. Para finalizar, y con el objetivo futuro de implementar los electrodos desarrollados en análisis amperométricos de medidas diferenciales, se ha realizado un pequeño estudio del efecto de la composición de los nanocompuestos sobre las características de respuesta de los electrodos, pensando en esta esta estrategia de análisis.

De forma más concreta, a continuación, se detallan las conclusiones parciales más relevantes extraídas de los estudios presentados en esta memoria:

1. Las características morfológicas del grafito de partida utilizado en la síntesis de óxido de grafeno reducido definen las propiedades electroquímicas del material transductor nanocompuesto final.
  - a. Se ha sintetizado rGO a partir de diferentes tipos de grafito comercial. Se han utilizado dos tipos diferentes de grafito comercial que han dado lugar a dos nanomateriales completamente distintos desde el punto de vista morfológico y estructural. El método de síntesis ha permitido obtener cantidades suficientes de rGO para el desarrollo y fabricación de transductores electroquímicos.
  - b. Se ha podido concluir que la respuesta electroquímica de los transductores nanocompuestos basados en rGO/epoxi, fabricados a partir de los distintos rGO sintetizados, muestra una gran diferencia en lo que a las propiedades eléctricas se refiere. Las características estructurales y morfológicas del grafito de partida determinan las futuras propiedades electroquímicas del rGO obtenido. El rGO2

- obtenido a partir de un grafito comercial de Sigma-Aldrich presenta unas características electroquímicas mejores, respecto al rGO1 obtenido a partir de un grafito comercial de Merck. Esto es debido a las diferencias estructurales y morfológicas del material de partida, por lo que estas afectan significativamente a las características del material conductor sintetizado.
- c. La respuesta electroquímica de las dos series de transductores construidos con los diferentes rGO sintetizados, presentan diferencias significativas de comportamiento electroquímico en lo que al material nanocompuesto respecta. El rGO1 dio lugar a transductores con una alta resistencia eléctrica, y teniendo en cuenta las propiedades electroquímicas que estos transductores tenían, se descartó su uso de este nanomaterial para el desarrollo y fabricación de transductores electroquímicos.
  - d. Se ha evaluado la respuesta analítica de los sensores mediante amperometría hidrodinámica como técnica de análisis. Los resultados corroboran el uso de rGO para el desarrollo y construcción de transductores electroquímicos. El sensor, con una composición del 15% de rGO2 presenta una buena sensibilidad y límite de detección para su aplicación en el desarrollo de (bio)sensores.
2. Durante los procesos de síntesis de grafeno es importante el grado de funcionalización alcanzado del rGO obtenido, ya que esta funcionalización define la incorporación óptima posterior de nanopartículas metálicas (NPs) que actúan como catalizadores.
- a. La síntesis de NPs metálicas mediante la técnica intermatricial, utilizando una resina de intercambio catiónico C100-E como matriz, y su posterior calcinación, no llegó a ser totalmente satisfactoria, debido a la incompleta calcinación del polímero, impidiendo de esta manera la obtención de NPs de forma aislada.
  - b. Se ha establecido una metodología sintética, que permite funcionalizar el rGO con NPs de diferentes metales. Se ha obtenido rGO funcionalizado con NPs metálicas de Ag, Au, Pd, y *bimetálicas* de Au/Pd en diferentes porcentajes en el material obtenido.

- c. Los análisis termogravimétricos muestran un alto grado de funcionalización del rGO con NPs metálicas. Este alto ratio de funcionalización del material está asociado con la propia naturaleza del material conductor de partida. Durante la oxidación del grafito a óxido de grafeno se introducen un gran número de grupos funcionales abundantes en oxígeno, que actúan como puntos de nucleación para el crecimiento posterior de las NPs.
3. Los nanocompuestos híbridos con rGO y NPs metálicas ofrecen propiedades sinérgicas de los dos materiales en el material transductor, pero es necesario tener un control eficaz tanto de la dispersión como de la proporción de estas partículas (NP@rGO) en el material nanocompuesto.
    - a. La presencia de NPs metálicas de Ag no muestra un efecto catalítico en los electrodos nanocompuestos de rGO/epoxi sobre la oxidación del peróxido de hidrógeno. Las NPs de Ag son oxidadas a  $\text{Ag}_2\text{O}$  a un potencial muy bajo ( $\sim 190$  mV), lo que impide el uso de este material híbrido para la construcción de electrodos transductores nanocompuestos y su posterior aplicación como (bio)sensores basado en oxidación (detección de peróxido de hidrógeno).
    - b. Se han construido transductores electroquímicos utilizando como material conductor rGO funcionalizado con NPs de Au, Pd y NPs *bimetálicas* de Au/Pd. Los transductores fueron caracterizados electroquímicamente y evaluados mediante amperometría hidrodinámica. Se ha conseguido disminuir el potencial de oxidación para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a 800 mV. Este potencial de oxidación es 200 mV más pequeño que el de otros sensores desarrollados en el grupo de investigación como, por ejemplo, el sensor de 15% de grafito, cuyo potencial de oxidación es de 1000 mV.
    - c. En reglas generales, se muestra una mejora de la respuesta analítica y una mejor estabilización de la señal analítica registrada en todos los transductores que incorporan NPs en el nanocompuesto, independientemente del tipo de NP metálica utilizada.

- d. Se han construido biosensores, utilizando la enzima glucosa oxidasa (GOD), utilizando como material conductor rGO y 2Au/Pd-NP@rGO. Se han estudiado las diferentes propiedades electroquímicas del biosensor en función de la composición del nanocompósito del transductor. Se ha variado la cantidad de material conductor (rGO), el tipo de NPs *bimetálicas* (1Au/2Pd; 2Au/3Pd) y la cantidad de rGO funcionalizado (Au/Pd-NP@rGO) en el seno del material transductor. El biosensor 2Au/3Pd-NP/GOD@rGO<sub>11%</sub> mostró las mejores propiedades electroquímicas, con una composición del 1 % en GOD, 3% 2Au/3Pd-NP@rGO, y un 11 % de rGO. Este biosensor presenta unas propiedades electroanalíticas de respuesta óptimas para la detección glucosa.
- e. Se ha demostrado que, variando la composición de los electrodos que actúan como transductor y como biosensor para futuras aplicaciones de medidas diferenciales para la eliminación de interferencias, es posible obtener electrodos con un comportamiento electroquímico semejante a pesar de su distinta composición.

