

Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© por Fausto Nahuel Comba

"Diseño de nuevos (bio)sensores electroquímicos basados en el uso de compósitos de grafito modificados con grafeno y nanopartículas de magnetita"

Fausto Nahuel Comba



Tesis Doctoral

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Físico-Química

Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba

Argentina, marzo de 2014.

problema n-1
valor final 681.457
..... C
valor inicial 12412
.....
autor
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
data de entrega 7/7/2014

LDB		
-----	--	--

El presente trabajo de tesis fue realizado en el INFIQC, Departamento de Físico-Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Prof. Dr. Gustavo A. Rivas y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.



Prof. Dr. Gustavo A. Rivas

Comisión Evaluadora:



Prof. Dra. Alicia Veglia



Prof. Dra. Susana Genti



Prof. Dra. Dolores Rubianes



Prof. Dr. Luis Dante Martinez

(Evaluador externo)

A mis abuelos, Rosa, Amanda, Aníbal y Anselmo

A mis padres, Anselmo y María Cristina

A mis hermanos, Ezequiel, Quimey y Rocío

A Micaela

“Creo que el mundo necesita gente alegre con altas dosis de locura y conciencia tranquila”

Anónimo.

Agradecimientos

A Gustavo Rivas, por confiar en mí y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por todo el saber compartido, por la asistencia brindada y por darme dirección cuando anduve sin rumbo. Por su infinita paciencia con mi “colgidez”, por su admirable capacidad de trabajo y por ser un compañero más de trabajo con el que es posible pasar buenos momentos.

A Dolores Rubianes, por encaminarme y orientarme siempre, por transmitirme su entusiasmo y ganas, por la dedicación, por preocuparse y ocuparse, por enseñarme y demostrarme el funcionamiento de todo esto. Por la gran paciencia que me ha tenido y por escucharme.

A los integrantes de mi comisión de tesis, Dra. Alicia Veglia, Dra. Dolores Rubianes, Dra. Susana Genti y al Dr. Dante Martínez (evaluador externo) por haberme acompañado en este camino y por sus aportes al trabajo de Tesis.

A la Facultad de Ciencias Químicas, al departamento de Físico Química y al INFIQC por brindarme el espacio para poder realizar el doctorado y desempeñarme como docente.

A la Dra. Pilar Herrasti, por electrosintetizar y proveerme de las nanopartículas de magnetita, y por su colaboración en la obtención de las imágenes de SEM.

A mis padres, Anselmo y María Cristina, cuyo ejemplo de dignidad, honestidad y demás valores inculcados llevaré toda mi vida. Por darme aliento, confianza, pero por sobre todo transmitirme serenidad y sabiduría.

A mis hermanos; Ezequiel, Quimey y Rocío, por la paciencia, compañía y el aguante, por los graciosos “acting”, anécdotas miramarenses y porque no también las peleas eternas...

A “mi compañera de viaje”, Micaela, por su amor, bondad y compañía, sobre todo en estos últimos meses de escritura de la tesis. Sin su apoyo y ánimo brindado hubiera sido más difícil la recta final.

A mis grandes amigos del alma, Diego y Bruno, de seguro sus consejos y la forma compartida de ver la vida sin tanta parafernalia elitista, han hecho de esta experiencia, algo más enriquecedor aún.

A mis “hermanos académicos” Lucio y Andrés, por compartir una visión, aspiración y entusiasmo. Por las palabras de aliento y los almuerzos inspiradores en enfermería.

Agradecimientos

A Elisa Herrera, por su amistad de hierro, apoyo y ante todo su transparencia. Por “cantarme la justa”! Gracias petisa!

A Juli Riva, sin dudas una amiga que supo escucharme, aconsejarme, entenderme y reírse con mis códigos de pueblo chico, muy parecidos a los suyos.

A mi amiga, la “especie radicalaria Raqueloides Moiraghi”. Por su honestidad intelectual y las enriquecedoras discusiones de política y actualidad.

A Cecilia Vásquez y Nico Oldani, por brindar sincera compañía y amistad durante aquellos solitarios y duros primeros meses del doctorado.

A Fabiana “La gringa” Gutierrez, por su amistad y la gran paciencia que me ha tenido durante éste trayecto, una de las personas con el corazón más grande que he conocido, mi sincero y eterno agradecimiento excede ampliamente a su desinteresada ayuda con las medidas de impedancia.

A Yami Jalit, por su amistad y enseñarme que la paciencia, voluntad y fortaleza infinita son posibles cuando existe una meta.

A Victoria Bracamonte, por no dudar en mostrar su sensibilidad y sincero acompañamiento en momentos difíciles.

A Emiliano Primo, por su gran compañerismo, consejos, códigos, practicidad y sentido común.

A Laurita Pedano, por su sencillez, entusiasmo, sus palabras de aliento y ayuda desinteresada, por sus consejos y experiencia.

Al querido Aurelio “franchute” Gasnier, por su amistad y compañerismo, por las charlas de actualidad y los chistes, por compartir horas de trabajo en el laboratorio de forma distendida, tranquila y sin la estridencia y “melaza” de radio Mía!

A Pablo Dalmasso, por las largas charlas, intercambiando opiniones, experiencias y algunas “chicanas” amistosas. Por aguantar alguna que otra vez mi “salto de térmica”, entenderme y aceptarme.

A Marquiños Eguilaz, por su compañerismo y camaradería masculina.

A Guillermina Luque, por ser tan buena persona, sus consejos y ante todo la buena onda y optimismo.

A Nancy Ferreyra, por su voluntad y predisposición, pero por sobre todo por ayudar desinteresadamente cuando lo necesité, por sus palabras criteriosas y su ejemplo de responsabilidad.

A Facu García, por tenderme una mano o prestarme una oreja en el momento justo.

A Tomás Benavidez, Manuel Perez, Matías Berdakin, Rodrigo Gibilisco, Luis Perez, Joaquin Klug, Franco Vega, Juancito Ovejero, Javi Barrera, Juli Pepino, Adriana Bosolasco, Juan Pablo Aranguren, German Lener, Fernando Pomiro, "Taqui" Erro, Ricardo Rojas, Fernano Garay y Lucas Colombo, por las charlas, discusiones, cafés, mates, largos almuerzos en el comedor universitario, chistes en el pasillo, juntadas, asados en la cantina, partidos de básquet y paddle, por los buenos momentos...

A Florencia Stragliotto, Mariana Achad, Maru Cuellar, Eliana Farías por la complicidad, chistes, compañerismo y almuerzos compartidos.

A Guadalupe Miñambres y Anita Basso, por ser como son, desestructuradas, charlatanas, ingeniosas y alegres. Por tantas juntadas y "cervezonas" en Marconi!

A mis amigos de Miramar: Luciano, Adrián, Damián, Marcos, Matías, Pablo, Carlitos y Cristian, justamente porque la gran mayoría de la barra no entiende mucho a que me dedico, ellos han sido una de los mejores cables a tierra y conexión con mis orígenes. Por los "asadozos", bagna caudas y por las cervezas, mates y melancías en la costanera, algún garaje o galpón hablando "huevadas" hasta la madrugada como si el tiempo no hubiera pasado.

A Susana Amatto, por su asistencia, honestidad y hacer del "bunker" donde trabajamos un lugar un poco mas salubre. Por su incansable lucha.

A María Laura Buyulaqui, por sus buenas vibras, asistencia y salvarme unas cuantas veces con el cañón del INFIQC.

A las secretarias y secretario del Departamento de Físico Química: Ana María, Nora y Antonio, por hacer su trabajo con tanta predisposición y "salvarme las papas" con los papeles más de una vez.

A mis alumnos, por dejarme aprender con ellos. Durante estos años de trabajo han sido la conexión más directa con el resto de la sociedad en mi quehacer profesional diario.

A los organismos que financiaron mi trabajo de Tesis Doctoral. CONICET, ANPCyT, SECyT-UNC. Especialmente a ANPCyT y CONICET, por las becas recibidas.

Por último y no por esto menos importante, quisiera agradecer a aquellas jugosas mocosas que generosamente apuntalaron mi espíritu durante gran parte del desarrollo de este trabajo de tesis.

¡Muchas gracias a todos!

Indice

Abstract	I
Resumen	III
Publicaciones	V
Indice de siglas y abreviaturas.....	VII

Capítulo I: Introducción

1. Sensores y biosensores	3
1.1. Definición.....	3
1.2. Clasificación de los biosensores según el tipo de transducción	5
1.3. Clasificación de los biosensores según el elemento de biorreconocimiento	6
1.3.1. Biosensores catalíticos	6
1.3.2. Biosensores de afinidad	9
2. Métodos de inmovilización de biomoléculas	9
3. Biosensores enzimáticos amperométricos	13
3.1. Cinética de las reacciones enzimáticas y determinación experimental de los parámetros cinéticos del bioelectrodo.....	14
4. Biomoléculas empleadas	18
4.1. Glucosa oxidasa.....	18
4.2. Otras proteínas empleadas	19
5. Nanomateriales	21
5.1. Nanopartículas de magnetita	22
5.1.1. Características generales	22
5.1.2. Síntesis de magnetita	23
5.2. Grafeno	29
5.2.1. Características generales	29
5.2.2. Síntesis del grafeno	30
5.2.2.1. Síntesis física	31
5.2.2.2. Síntesis química	32
6. Organización y presentación del trabajo de tesis.....	35
7. Bibliografía.....	37

Capítulo II: Materiales y métodos

1. Técnicas empleadas	51
1.1. Electroquímicas	51
1.1.1. Técnicas de barrido de potencial	52
1.1.1.1. Voltamperometría cíclica	52
1.1.1.2. Voltamperometría de pulso diferencial	57
1.1.2. Técnicas de pulso de potencial	59
1.1.2.1. Cronoamperometría	59
1.1.2.2. Amperometría	60
1.1.2.3. Voltamperometría hidrodinámica	62
1.1.3. Técnicas de preconcentración	63
1.1.4. Espectroscopía de impedancia electroquímica	65
1.1.4.1. Circuitos eléctricos equivalentes	67
1.1.5. Equipamiento utilizado	70
1.2. Microscopías	70
1.2.1. Microscopía electrónica de barrido	70
1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	72
1.3. Espectroscopías	73
1.3.1. Espectroscopía infrarroja	73
1.3.2. Espectroscopía Raman	74
1.4. Difracción de rayos X	74
2. Síntesis de los nanomateriales utilizados	75
2.1. Electrosíntesis de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄)	75
2.2. Síntesis química de grafeno	76
3. Celdas y electrodos utilizados	77
3.1. Electrodos compósito de grafito policristalino	79
3.1.1. Origen, estructura y propiedades	80
3.1.2. Preparación de los electrodos compósito de grafito policristalino	81
3.1.3. Características de los electrodos compósito de grafito policristalino	83
3.1.4. Modificación de electrodos compósito de grafito policristalino	84
4. Bibliografía	87

Capítulo III: Compósitos de grafito modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas

1. Introducción.....	93
2. Experimental.....	95
2.1. Reactivos.....	95
2.2. Instrumental	95
3. Resultados y discusión	96
3.1. Caracterización de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas.....	96
3.2. Caracterización electroquímica de CPE- Fe_3O_4 empleando diversos marcadores rédox.....	97
3.2.1. Respuesta electroquímica de peróxido de hidrógeno	98
3.2.2. Respuesta electroquímica de ácido ascórbico, ácido úrico y paracetamol	105
4. Conclusiones	108
5. Bibliografía.....	109

Capítulo IV: Efecto de la incorporación de proteínas a compósitos de grafito conteniendo nanopartículas de Fe_3O_4

1. Introducción.....	115
2. Experimental.....	116
2.1. Reactivos.....	116
2.2. Instrumental	116
2.3. Preparación del electrodo de trabajo.....	117
3. Resultados y discusión	117
3.1. Respuesta voltamperométrica de peróxido de hidrógeno sobre CPE- Fe_3O_4 modificado con albúmina.....	117
3.2. Efecto de la relación Fe_3O_4 /Albúmina en la respuesta amperométrica a peróxido de hidrógeno.....	120
3.3. Efecto de la relación Fe_3O_4 /albúmina en la respuesta impedimétrica a peróxido de hidrógeno.....	124
3.4. Estudio de la incorporación de otras proteínas a CPE- Fe_3O_4	130
3.5. Estudio de la influencia de la presencia y tipo de surfactante en la superficie de las nanopartículas de Fe_3O_4	138

3.6. Caracterización superficial	141
4. Conclusiones	142
5. Bibliografía.....	143

Capítulo V: Desarrollo de un biosensor enzimático para glucosa a partir de compósitos de grafito conteniendo nanopartículas de Fe_3O_4

1. Introducción.....	150
2. Experimental.....	152
2.1. Reactivos.....	152
2.2. Preparación del electrodo de trabajo.....	153
3. Resultados y discusión	153
3.1. Respuesta amperométrica de glucosa sobre CPE-GOx y CPE- Fe_3O_4 -GOx	153
3.2. Efecto de la proporción de GOx en la respuesta a glucosa	156
3.3. Estudio de la selectividad en la respuesta del biosensor.....	161
3.4. Estabilidad del biosensor	163
3.5. Aplicación analítica del biosensor	165
3.6. Comparación del desempeño analítico de CPE- Fe_3O_4 -GOx con un compósito de grafito conteniendo nanopartículas de Fe	165
4. Conclusiones	168
5. Bibliografía.....	169

Capítulo VI: Desarrollo de un sensor para dopamina mediante la incorporación de grafeno en un compósito de grafito

1. Introducción.....	178
2. Experimental.....	180
2.1. Reactivos.....	180
2.2. Instrumental	180
3. Resultados y discusión	181
3.1. Caracterización de R-GrO y CPE-R-GrO	181
3.1.1. Caracterización espectroscópica de R-GrO	181
3.1.2. Caracterización por microscopía electrónica de barrido de CPE-R-GrO	184

3.1.3. Comportamiento electroquímico de dopamina	185
3.2. Comportamiento voltamperométrico de AA y Ser sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P	187
3.3. Aplicación analítica de CPE-R-GrO 30,0 % P/P	188
4. Conclusiones	198
5. Bibliografía.....	198

Capítulo VII: Conclusiones generales

Conclusiones generales.....	207
-----------------------------	-----

Abstract

In this thesis were developed electrochemical sensors based on the employment of graphite powder composites modified either with electro-generated nanoparticles of Fe_3O_4 or graphene, for the quantification of bioanalytes of clinical relevance like hydrogen peroxide, glucose and dopamine.

The excellent electrocatalytic properties of the Fe_3O_4 nanoparticles dispersed in the composite made possible the amperometric detection of hydrogen peroxide at very low potentials (-0,100 V) with the consequent improvement in the sensibility and selectivity of the sensor.

The simultaneous incorporation of different proteins (insulin, glucose oxidase, ovalizocim, mucin, albumin and casein) and Fe_3O_4 in the composite allowed to obtain a drastic improvement in the reduction signal of hydrogen peroxide, due to the considerable increment in the exposed electrocatalytic surface area. The presence of the proteins within the composite favors a more efficient dispersion of the Fe_3O_4 nanoparticles, which in turns produce a considerable increment in the exposed electrocatalytic surface area augmenting the electro-analytical signal. The synergic effect between the Fe_3O_4 nanoparticles and the proteins resulted in a significant decrease in the charge transfer resistance towards hydrogen peroxide reduction, thus, in an important increment in the sensitivity and repeatability of the amperometric response. This effect was highly dependent on the Fe_3O_4 /protein proportions and protein nature.

Due to the good response obtained with the above mentioned modified electrode for the amperometric reduction of hydrogen peroxide, we incorporated the enzyme glucose oxidase to obtain an amperometric biosensor for glucose. The analytical signal was obtained from the amperometric reduction of enzymatically-generated hydrogen peroxide. A sensitive, stable, reproducible and fast biosensor for the detection of glucose was obtained, allowing its use for direct quantification of glucose in human blood serum, with an excellent correlation with the conventional spectrophotometric technique.

Another aspect addressed in this thesis was the study of a new electrode for the development of electrochemical sensors based in the incorporation of chemically reduced graphene oxide in graphite composites. Through the employment of medium exchange adsorptive stripping voltammetry , the determination of submicromolar levels of dopamine was achieved, even in excess of ascorbic acid and serotonin.

The sensors proposed in this thesis, represent a strategy with a great potentiality for future development of electrochemical (bio)sensors using other biorecognition molecules and new transduction schemes.

Resumen

En este trabajo de tesis se desarrollaron sensores electroquímicos basados en el empleo de compósitos de grafito modificados con nanopartículas electrogeneradas de Fe_3O_4 o grafeno, dirigidos a la cuantificación de bioanalitos de gran relevancia clínica como peróxido de hidrógeno, glucosa y dopamina.

Las excelentes propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de Fe_3O_4 dispersas en el compósito hicieron posible la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno a muy bajos potenciales (-0,100 V) con la consecuente mejora en la sensibilidad y selectividad. La incorporación conjunta de distintas proteínas (insulina, glucosa oxidasa, ovulizozima, mucina, albúmina y caseína) y de Fe_3O_4 en el compósito permitió obtener una drástica mejora en la reducción de peróxido de hidrógeno debido al aumento considerable de la superficie electrocatalítica expuesta por una más eficiente dispersión de las nanopartículas. El efecto sinérgico entre Fe_3O_4 y la proteína, que se tradujo en una significativa disminución de la resistencia de transferencia de carga de peróxido de hidrógeno, en un marcado incremento de la sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno y en una mayor reproducibilidad en la respuesta amperométrica, fue altamente dependiente de la relación entre las proporciones de Fe_3O_4 y proteína y de la naturaleza de la proteína.

Se desarrolló un biosensor amperométrico para glucosa mediante dispersión de las nanopartículas de Fe_3O_4 y la enzima glucosa oxidasa. La señal analítica se obtuvo a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno enzimáticamente generado, lográndose una detección de glucosa sensible, selectiva, reproducible, estable y rápida, lo que permitió el empleo de estos biosensores para la cuantificación directa de glucosa en suero sanguíneo humano con una excelente correlación con la técnica espectrofotométrica convencional.

Otro aspecto abordado en este trabajo de tesis fue el estudio de un nuevo electrodo para el desarrollo de sensores electroquímicos basados en la incorporación de óxido de grafeno reducido químicamente en un compósito de grafito. Mediante el empleo de *stripping* voltamperométrico adsorptivo con cambio de medio asociado con

voltamperometría de pulso diferencial, se logró la determinación de dopamina a niveles submicromolares aún en presencia de un exceso de ácido ascórbico y de serotonina. Los sensores propuestos en este trabajo representan una estrategia con una gran potencialidad para futuros desarrollos de (bio)sensores electroquímicos empleando otras moléculas de biorreconocimiento y nuevos esquemas de transducción.

Publicaciones

De este trabajo de tesis surgieron las siguientes publicaciones:

- **“Highly selective and sensitive glucose biosensing at carbon paste electrodes modified with electrogenerated magnetite nanoparticles and glucose oxidase”.**
Fausto N. Comba, M. D. Rubianes, L. Cabrera, Silvia Gutiérrez, Pilar Herrasti, Gustavo A. Rivas. *Electroanalysis*, **22 (2010) 1566–1572.10.**
- **“Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles”.**
Fausto N. Comba, María D. Rubianes, Pilar Herrasti, Gustavo A. Rivas. *Sensors and Actuators B*, **149 (2010) 306-309.**
- **“Effect of the incorporation of proteins on the performance of carbon paste electrodes modified with electrogenerated magnetite nanoparticles towards the reduction of hydrogen peroxide”.**
Fausto N. Comba, Fabiana Gutiérrez, Pilar Herrasti, María D. Rubianes, Gustavo A. Rivas. *Electroanalysis*, **24, (2012) 1541-1546.7.**

Indice de siglas y abreviaturas

AA: ácido ascórbico

AU: ácido úrico

Adsv: “*stripping*” voltamperométrico adsortivo

Alb: albúmina

Cas: caseína

CPE: electrodo compósito de grafito.

CPE-Fe₃O₄: electrodo compósito de grafito modificado con Fe₃O₄

CPE-R-GrO: electrodo compósito de grafito modificado con R-GrO

DPV: voltamperometría de pulso diferencial

EIE: espectroscopía de impedancia electroquímica

Fe₃O₄ : nanopartículas de magnetita electrosintetizadas

Fe₃O₄ (SQ): nanopartículas de magnetita sintetizadas químicamente

GrO: óxido de grafeno

GOx: glucosa oxidasa

Ins: insulina

Lis: ovolisozima

Muc: mucina

PCTM: paracetamol

R-GrO: grafeno proveniente de la reducción química del GrO

VC: voltamperometría cíclica

*“Defender la alegría como una trinchera
defenderla del escándalo y la rutina de la miseria
y los miserables de las ausencias transitorias
y las definitivas”*

Mario Benedetti.

Capítulo I

Introducción general

Introducción general

En este capítulo se presentan las características generales de los sensores y biosensores, su clasificación según el mecanismo de transducción y el elemento de biorreconocimiento, así como también una descripción de las distintas metodologías de inmovilización de biomoléculas en la construcción de dichos dispositivos. Sobre la base del trabajo de tesis doctoral realizado, se enfatiza puntualmente en los bioelectrodos enzimáticos amperométricos. Asimismo, se detallan las características más importantes de las biomoléculas utilizadas. Finalmente se presentan las principales propiedades de los nanomateriales utilizados en la construcción de los (bio)sensores desarrollados.

1. Sensores y biosensores

1.1. Definición

Desde el desarrollo del primer bioelectrodo para glucosa por Clarck y Lyons en el año 1962 [1], en los últimos años el campo de los sensores químicos en general y de los biosensores en particular ha experimentado un enorme y continuo crecimiento. Éste ha sido impulsado a partir de la demanda de metodologías no sólo sensibles, selectivas y fiables, sino también sencillas de usar, de bajo costo, rápidas, miniaturizables y portables que permitan la detección de especies de interés. En este sentido, la confluencia de grandes áreas del conocimiento como la física, la química, la biología y las ingenierías ha permitido el desarrollo de novedosas y eficientes metodologías de detección de analitos de interés bioquímico, fármaco-toxicológico, forense, agroindustrial, ambiental [2].

Un sensor químico es un dispositivo capaz de transformar información química en una señal analíticamente útil y está constituido básicamente por una capa de reconocimiento y un transductor fisicoquímico. El elemento de reconocimiento le otorga al dispositivo selectividad mediante alguna interacción específica con el analito, mientras que el elemento transductor permite transformar el cambio fisicoquímico

producido por el proceso de reconocimiento (luz, calor, flujo de electrones) en una señal analíticamente útil [3, 4].

Los biosensores constituyen un grupo dentro de los sensores que presentan la particularidad de estar formados por una capa de biorreconocimiento. En estos dispositivos el evento de reconocimiento involucra un proceso bioquímico mediado por moléculas biológicas como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores [2, 3].

En la **Figura 1** se muestra el esquema básico de un (bio)sensor. Como se observa, para construir un biosensor el sistema de reconocimiento biológico debe inmovilizarse o retenerse sobre la superficie del transductor.

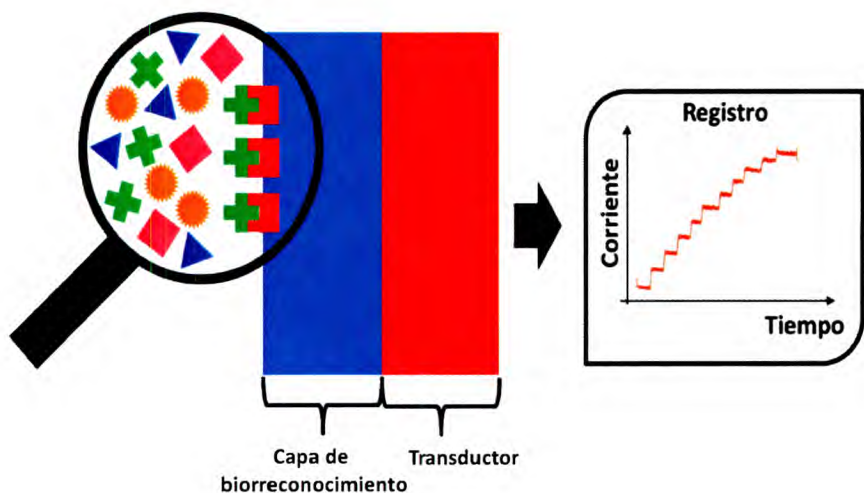


Figura 1. Esquema de un biosensor

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha nos provee de un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada especie o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies puede ser empleado con fines analíticos para el diseño y preparación de biosensores. El transductor, en el cual se encuentra inmovilizada o retenida la molécula de biorreconocimiento, debe convertir la señal fisicoquímica que se produce como consecuencia de la interacción del analito con el elemento de biorreconocimiento en una respuesta eléctrica, que luego es amplificada o procesada y

que estará relacionada con la concentración de ese analito. Dicho transductor, por tanto, determina la eficiencia de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la interacción específica entre el componente biológico y el analito [6].

Para un adecuado desempeño, los (bio)sensores deben cumplir con una serie de requerimientos, entre ellos se destacan una alta sensibilidad y selectividad dentro de un intervalo dinámico amplio de concentración del analito de interés, rápida respuesta, precisión, reproducibilidad, robustez y que la interacción con el analito sea de naturaleza reversible. Es deseable también, que dicho dispositivo sea portable y de accesible costo de fabricación [7, 8].

En forma general, la clasificación de los biosensores puede realizarse desde dos puntos de vista, de acuerdo con la naturaleza del proceso biológico involucrado en el reconocimiento y con el material transductor [6]. A continuación, se indican los métodos de transducción más utilizados en (bio)sensores, y su clasificación basada en el evento de biorreconocimiento. Además, se analizan las diferentes formas de modificación de superficies de electrodos con biomoléculas haciendo especial énfasis en la utilización de enzimas.

1.2. Clasificación de los biosensores según el tipo de transducción

De acuerdo con el mecanismo de transducción de la señal, los biosensores se clasifican en: electroquímicos, ópticos, térmicos y piezoeléctricos, entre los más destacados [7, 9, 10]. En la **Tabla 1** se resume el fundamento de estos métodos de transducción junto a las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Como se mencionó anteriormente, en el marco de este trabajo de tesis han sido empleados los biosensores con transducción electroquímica. Es importante destacar, que los biosensores electroquímicos son los más utilizados actualmente, este hecho se debe principalmente a una serie de ventajas como la rapidez de su respuesta, bajo costo y relativa simplicidad de instrumentación [6].

1.3. Clasificación de los biosensores según el elemento de biorreconocimiento

Como se mencionó anteriormente, los biosensores pueden clasificarse en función de los elementos biológicos utilizados en el evento de reconocimiento. Estos pueden ser enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, aptámeros, microorganismos, tejidos, células, membranas, entre otros. De acuerdo con esto, se los puede diferenciar en dos grandes grupos: biosensores catalíticos (utilizan enzimas, células o tejidos) y biosensores de afinidad (basados en anticuerpos, receptores de membrana o ácidos nucleicos) [10].

1.3.1. Biosensores catalíticos

Estos biosensores se basan en el reconocimiento selectivo de un sustrato y su transformación en productos a través de una reacción catalizada por una enzima o sistema similar presente en un medio biológico como pueden ser células completas o tejidos [9, 19].

Entre los biosensores catalíticos, los enzimáticos son, sin duda, los más utilizados y estudiados. La reacción biocatalítica posee como principal ventaja su alta especificidad por el sustrato y eficiencia. De esta forma se combinan dos factores muy importantes necesarios para la mayoría de las aplicaciones analíticas de un sensor, el biorreconocimiento particular y la amplificación del cambio fisicoquímico. En este sentido, el acoplamiento de estos biocatalizadores con técnicas analíticas altamente sensibles ha permitido su aplicación en muchos campos como la química clínica, forense, ambiental así como también en bioprocesos en la industria farmacéutica y alimenticia [12].

Tipo de transductor	Técnica empleada	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Electroquímico	Amperometría	Se mide la corriente resultante de la óxido-reducción de una especie electroactiva sobre la superficie del electrodo mientras se aplica un potencial constante [6, 10]	Rapidez de respuesta, bajo costo de instrumentación [6, 10]	Sensibilidad a perturbaciones eléctricas y magnéticas
	Potenciometría	Se determina la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y el de trabajo generada por el cambio de actividad del analito, en condiciones donde no circula la corriente [13–15]	Alta selectividad, bajo costo, sencillez, rapidez de respuesta y amplio intervalo lineal [10]	Límites de detección altos [10]
	Conductimetría	Medición de los cambios de conductancia a través de un par de electrodos sumergidos en una solución electrolítica	Posibilidad de acoplamiento a un número importante de reacciones enzimáticas que involucran el consumo o producción de especies cargadas [16]	Baja selectividad y fuerte dependencia de la señal electroquímica con la temperatura [16]

<p>Opticos</p>	<p>Absorción UV-visible Luminiscencia, Quimioluminiscencia, SPR, IR, Raman</p>	<p>Determinación de la absorción, emisión o dispersión de energía radiante [12].</p>	<p>Altamente específica. No se presenta interferencia eléctrica ya que la señal no se encuentra afectada por campos magnéticos o eléctricos [12].</p>	<p>Interferencia por parte de la luz del entorno. Necesidad de especies que absorban, emitan o dispersen la radiación. En algunos casos, necesidad de reactivos adicionales. Dificultosa posibilidad de miniaturización [2, 4].</p>
<p>Térmicos</p>	<p>Flujo de calor</p>	<p>Detección del intercambio de calor con el medio a partir de una reacción específica. La mayoría de los sensores térmicos se centran en la medición del cambio de entalpía durante las reacciones enzimáticas [5].</p>	<p>Posibilidad de reutilizar el biocatalizador, factibilidad de efectuar operaciones en flujo continuo, sencillez. Es posible trabajar con analitos independientemente de sus propiedades ópticas o electroquímicas [17].</p>	<p>Baja especificidad en las determinaciones. El Instrumental necesario es costoso y complejo [17].</p>
<p>Piezoeléctricos</p>	<p>Ondas acústicas Microbalanza de cristal de cuarzo</p>	<p>El mecanismo de detección de estos dispositivos es a través del cambio de oscilación de una onda mecánica o acústica producida por la modificación superficial de un transductor compuesto por un material piezoeléctrico. El ejemplo más conocido de aplicación de este principio es la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) [18] .</p>	<p>Dispositivos relativamente, sensibles y confiables [19].</p>	<p>Poco selectivos y muy sensibles a las perturbaciones mecánicas, pH, conductividad y permeabilidad dieléctrica. Difícil miniaturización [19].</p>

Tabla 1. Fundamento, ventajas y desventajas de los mecanismos de transducción más utilizados en biosensores

1.3.2. Biosensores de afinidad

Estos biosensores se basan en la interacción específica de ciertas biomoléculas como pueden ser anticuerpos, receptores celulares y ácidos nucleicos con una molécula “*target*”. A diferencia de los sensores catalíticos, durante el evento de biorreconocimiento no hay una reacción química que produzca un consumo neto de la especie a detectar. El proceso de biorreconocimiento está gobernado principalmente por la termodinámica de la interacción biológica en contraste con el control cinético que presentan los biosensores catalíticos [12].

La naturaleza de las interacciones en las cuales se basan estos dispositivos son del tipo antígeno-anticuerpo (inmunosensores), ligando-receptor, complementariedad entre cadenas de ADN de simple hebra (genosensores) o aptámeros con moléculas específicas de interés (aptasensores). Dentro de los biosensores de afinidad, los más desarrollados son los inmunosensores. Al igual que los sensores enzimáticos, la principal ventaja que presentan estos dispositivos es su gran selectividad debido a la alta afinidad que presentan sus interacciones biomoleculares [10, 21].

2. Métodos de inmovilización de biomoléculas

El buen funcionamiento de un biosensor depende, en gran medida, de la inmovilización del sistema de biorreconocimiento sobre el transductor. El objetivo primordial es permitir un contacto íntimo entre el transductor y la biomolécula sin alterar la conformación y actividad biológica de la misma. Además, es deseable que la inmovilización utilizada sea reproducible y estable y permita controlar la cantidad de material biológico en cuestión. Existen diferentes esquemas de inmovilización de biomoléculas sobre superficies transductoras. Lo más importante es que el soporte sobre el cual se inmovilizará la biomolécula sea química y físicamente estable [21–23].

Los métodos de inmovilización de biomoléculas más utilizados son: mediante unión covalente, adsorción directa, autoensamblado capa por capa, atrapamiento en geles y

matrices poliméricas, entrecruzamiento e inclusión en compósitos. En la **Figura 2** puede observarse, a modo comparativo, una representación esquemática de las metodologías de inmovilización de biomoléculas mencionadas. En la **Tabla 2** se presentan las principales características junto a las ventajas y desventajas de los mismos.

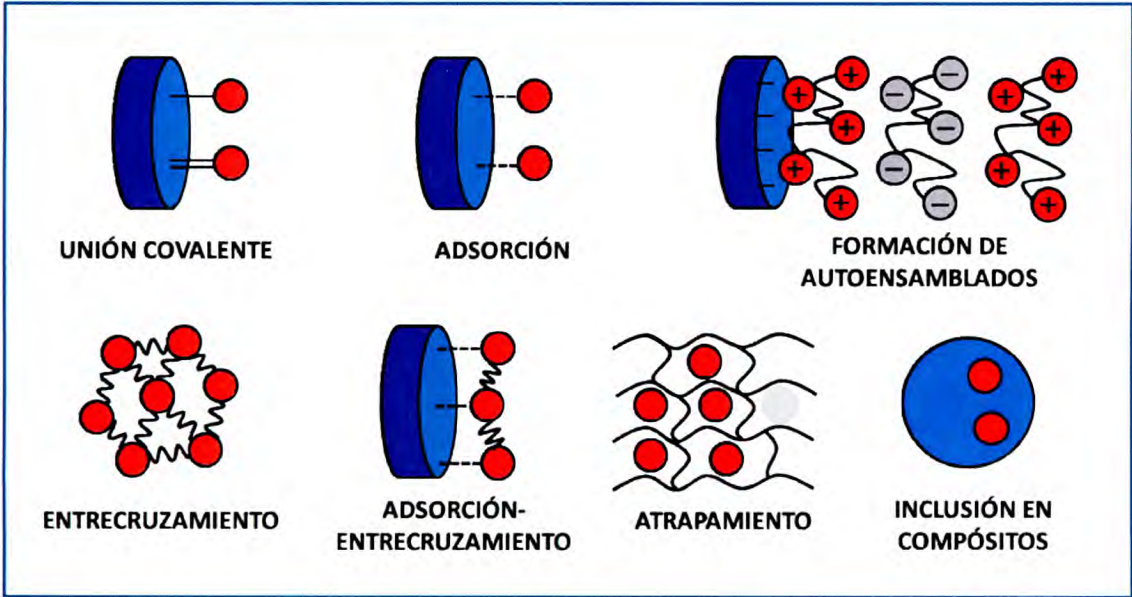


Figura 2. Métodos de inmovilización de biomoléculas en biosensores.

En este trabajo de tesis doctoral la inmovilización de las biomoléculas fue efectuada a partir de la inclusión en compósitos de grafito y aceite mineral. En el capítulo II se describen con mayor detalle las características de este material electrónico. En los capítulos III, IV y V se presentan diversos (bio)sensores elaborados con estos compósitos modificados con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) conteniendo distintas proteínas como glucosa oxidasa, albúmina, insulina, ovolisozima, mucina y caseína. En el capítulo VI se describe un sensor para dopamina a partir de la incorporación de grafeno en el compósito de grafito.

Inmovilización	Características	Ventajas	Desventajas
<p><i>Adsorción directa</i> [21–23]</p>	<p>Consiste en poner en contacto la biomolécula con la superficie transductora para que se establezcan interacciones electrostática, hidrofóbicas, de van der Waals o puente hidrógeno.</p>	<p>Sencillez y rapidez. No se necesitan reacciones adicionales y la perturbación en la conformación de la biomolécula es baja.</p>	<p>Biomoléculas susceptibles a la desorción, especialmente ante convección y cambio de pH, fuerza iónica y temperatura.</p>
<p><i>Autoensamblado</i> [22, 33]</p>	<p>Conocida también como adsorción capa por capa. Se basa en la deposición alternada de monocapas de polielectrolitos de cargas opuestas sobre superficies sólidas. Estos procesos de deposición se llevan a cabo en varias etapas hasta obtener el número deseado de capas.</p>	<p>Simpleza y mayor control en la construcción de la superficie activa. Estrategia racional para el diseño de arquitecturas supramoleculares.</p>	<p>Alta dependencia de los cambios de pH, fuerza iónica y temperatura. Gran consumo de tiempo.</p>
<p><i>Atrapamiento en matrices poliméricas</i> [21–23]</p>	<p>Retención física de las biomoléculas mediante su incorporación en un polímero o un gel. Por disolución de la biomolécula en la matriz y posterior deposición sobre el transductor. Otra alternativa consiste en atrapar el biocomponente mediante electropolimerización sobre la superficie transductora.</p>	<p>Se preserva la bioactividad, ya que no existe reacción química entre el soporte molecular y la biomolécula.</p>	<p>Lixiviación o pérdida del biocomponente. Puede generar problemas difusionales.</p>

Inmovilización	Características	Ventajas	Desventajas
Entrecruzamiento [21–23]	Atrapamiento por entrecruzamiento de las biomoléculas empleando agentes bifuncionales, multifuncionales y polímeros. Entre los entrecruzantes más utilizados en biosensores se encuentran glutaraldehído, glioxal y hexametildiamina.	Simplicidad y estabilidad de la unión covalente lograda entre las biomoléculas o con la macromolécula soporte.	Barrera difusional y pérdida de actividad biológica debido a la distorsión conformacional y alteración química. Toxicidad del glutaraldehído. Reacción de entrecruzamiento difícil de controlar.
Unión covalente [22, 23]	Unión entre grupos funcionales del soporte y de la biomolécula. Es crucial que los grupos funcionales de la biomolécula no estén comprometidos en el evento de biorreconocimiento.	Mayor estabilidad en condiciones drásticas como convección hidrodinámica y temperatura.	Pérdida de actividad biológica en el proceso de anclaje sobre la superficie transductora.
Inclusión en compósitos [25–33]	Inclusión del elemento de biorreconocimiento en la matriz transductora a partir de la dispersión en el material conductor (grafito, nanotubos de carbono o carbono vítreo entre otros) con un aglutinante no conductor.	Rápida respuesta debido a la ausencia de barreras difusionales. Metodología versátil y de bajo costo. Rápida preparación, baja toxicidad y volatilidad e inercia química.	Actividad enzimática dependiente del entorno hidrofóbico debido al aglutinante utilizado.

Tabla 2. Características, ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización de biomoléculas para la construcción de biosensores.

3. Biosensores enzimáticos amperométricos

Entre los biosensores enzimáticos, los más utilizados son los que se basan en la transducción amperométrica. Tal como se indicó en la **Tabla 1**, en los biosensores amperométricos se aplica un potencial constante y se mide la corriente obtenida como consecuencia de una reacción de óxido-reducción de una especie electroactiva sobre el electrodo. El potencial de trabajo debe seleccionarse de acuerdo con el analito a determinar: sustrato o producto de la reacción enzimática, o mediador de la regeneración enzimática [10, 11].

De acuerdo con la estrategia de medición, los biosensores enzimáticos amperométricos pueden ser de [34]:

- **Primera generación:** la señal se determina directamente a partir de algún compuesto involucrado en la reacción. Pueden ser sustratos, productos o cofactores. El inconveniente de esta metodología, en el caso particular de enzimas oxidasas, es que para la detección del oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno generado se necesitan elevados sobrepotenciales. De esta forma, existe el riesgo de oxidar o reducir potenciales interferentes electroactivos habitualmente presentes en fluidos biológicos como el ácido ascórbico, ácido úrico, paracetamol, entre otros. Esto condujo a la utilización de mediadores redox dando origen a los biosensores amperométricos de segunda generación [1, 35].
- **Segunda generación:** están basados en la utilización de un mediador redox artificial, que participa como regenerador del cofactor. Es necesario que este mediador posea un potencial redox bajo para evitar las reacciones de interferentes electroactivos. Los más utilizados son el ferri/ferrocianuro, 1-4 benzoquinona, derivados del ferroceno y azul de metileno [27, 28].
- **Tercera generación:** en este caso la transferencia electrónica ocurre directamente entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo. Una de las mayores dificultades en el desarrollo de este tipo de biosensores es la optimización de la transferencia mencionada ya que la gran mayoría de las

enzimas posee su centro activo en su interior y se hace muy difícil lograr un contacto directo con el transductor electroquímico [37, 38].

3.1. Cinética de las reacciones enzimáticas y determinación experimental de los parámetros cinéticos del bioelectrodo

Las enzimas son catalizadores biológicos y como tales aceleran reacciones bioquímicas sin formar parte de los productos ni degradarse en el proceso. En las reacciones enzimáticas, la molécula a ser transformada se denomina sustrato y generalmente requiere de otro reactivo llamado cofactor (iones metálicos) o coenzima (moléculas orgánicas de bajo peso molecular) para poder generar los correspondientes productos. Las enzimas reaccionan de forma específica con un sustrato o un grupo de sustratos relacionados [38].

La naturaleza catalítica de dicha reacción hace que las enzimas se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Cabe mencionar que los tiempos de respuesta son menores en relación a otro tipo de biorreceptores. Desde el punto de vista analítico, esto hace posible un monitoreo continuo, lo que no siempre ocurre con otros elementos de bioreconocimiento, como por ejemplo los anticuerpos al ser empleados en los inmunosensores [10, 34].

Por otro lado, es sabido que la actividad de las enzimas se relaciona no sólo con la concentración del sustrato sino también con el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de activadores e inhibidores. En este sentido, bajo condiciones extremas de temperatura, pH o inmovilización, la enzima sufre cambios conformacionales que producen un cambio en su bioactividad [38].

Las enzimas se clasifican en seis grupos de acuerdo al tipo de reacción en la que intervienen: óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. El grupo que presenta mayor importancia en el desarrollo de biosensores

electroquímicos es el de las óxido-reductasas, capaces de catalizar reacciones de óxido-reducción.

En 1913 Michaelis y Menten describieron la ecuación de velocidad para estos sistemas catalíticos a partir del estudio del efecto de la concentración inicial del sustrato (**S**) en la actividad enzimática. En primer lugar, esta teoría supone la formación de un complejo enzima-sustrato (**E-S**) para luego dar origen a la formación del producto (**P**) y la liberación de la enzima según el siguiente esquema:



donde k_1 , k_2 , y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada etapa. La velocidad (**V**) de una reacción catalizada por una enzima alcanza un valor máximo (V_{max}) cuando toda la enzima disponible se encuentra unida a **S**, es decir en condiciones de saturación de la enzima. Esta situación se presenta cuando la concentración de **S** en el medio es mucho mayor que la de **E**.

Al graficar **V** en función de la concentración de **S** para una cantidad constante de **E**, se observa una curva hiperbólica con dos regiones bien definidas. Una correspondiente a concentraciones de **S** bajas donde su relación con **V** es lineal, dando como resultado una cinética de primer orden y otra donde ésta se torna prácticamente independiente de la concentración de **S**. La primera región es la que presenta utilidad analítica, ya que **V** puede ser empleada para la determinación de la concentración de **S**. En la segunda región es donde el biocatalizador se encuentra saturado y puede ser utilizada para conocer la cantidad total de enzima activa presente en el sistema. Existe también una situación intermedia en la que el orden de reacción es de carácter mixto, ya que si bien **V** aumenta con la concentración de **S**, no lo hace de forma lineal [10, 34].

La expresión general de la velocidad de una reacción enzimática es:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación I}$$

donde K_M es un parámetro cinético importante conocido como la constante de Michaelis-Menten y definida como la concentración a la cual V adquiere el valor de la mitad de V_{max} . Ésta es independiente de la concentración de la enzima y dependiente de la temperatura, la fuerza iónica y el pH del medio de reacción. El valor de K_M está relacionado con la afinidad de la enzima por el sustrato.

Los valores de K_M y V_{max} se obtienen experimentalmente a partir del reordenamiento y linealización de la ecuación de Michaelis-Menten. Existen varios métodos de linealización, todos involucran la determinación de V en función de la concentración de S a una dada concentración de E . En este trabajo de tesis se utilizó el método de *Eadie-Hofstee* ya que es el más apropiado en el estudio de los biosensores enzimáticos [10, 11].

Para un biosensor enzimático con transducción amperométrica la V del proceso estará dada por la corriente generada (I) debido a la reacción electroquímica. De esta forma pueden obtenerse los parámetros cinéticos aparentes del biosensor a partir de la siguiente expresión:

$$I_{ss} = -K_M^{ap} \frac{I_{ss}}{[S]} + I_{max}^{ap} \quad \text{Ecuación II}$$

siendo I_{ss} la corriente estacionaria para una determinada concentración de sustrato en el medio, K_M^{ap} la constante aparente de Michaelis-Menten del sistema enzimático inmovilizado en el electrodo e I_{max}^{ap} la corriente máxima aparente del biosensor [10, 19]. Este método es útil para el estudio cinético de sistemas enzimáticos heterogéneos. Es decir, para conocer si un sistema con una enzima inmovilizada se

encuentra bajo control enzimático o difusional. Si al graficar I_{ss} en función de $\frac{I_{ss}}{[S]}$ se obtiene una recta en el intervalo de concentración de S estudiado, sobre todo a altas concentraciones, el control cinético del proceso es enzimático. En cambio, a concentraciones bajas de S, el proceso es gobernado por difusión en el sistema enzimático-amperométrico.

Como consecuencia de la inmovilización de una enzima sobre un soporte sólido como la superficie de un electrodo, los parámetros cinéticos K_M y V_{max} pueden ser muy distintos respecto de los valores encontrados para el biocatalizador en medio homogéneo. En el caso de que exista modificación de estos parámetros, ésta será propia de la situación particular de inmovilización. Esta modificación sucede porque la enzima es confinada a un microambiente distinto al del medio homogéneo. De esta forma, los valores hallados de K_M y V_{max} para un dado sistema pueden diferir ampliamente de los encontrados en solución, por lo que estos parámetros cinéticos son aparentes. A modo de ejemplo, en la **Figura 3** se muestra el diagrama de Eadie-Hofstee típico para un biosensor.

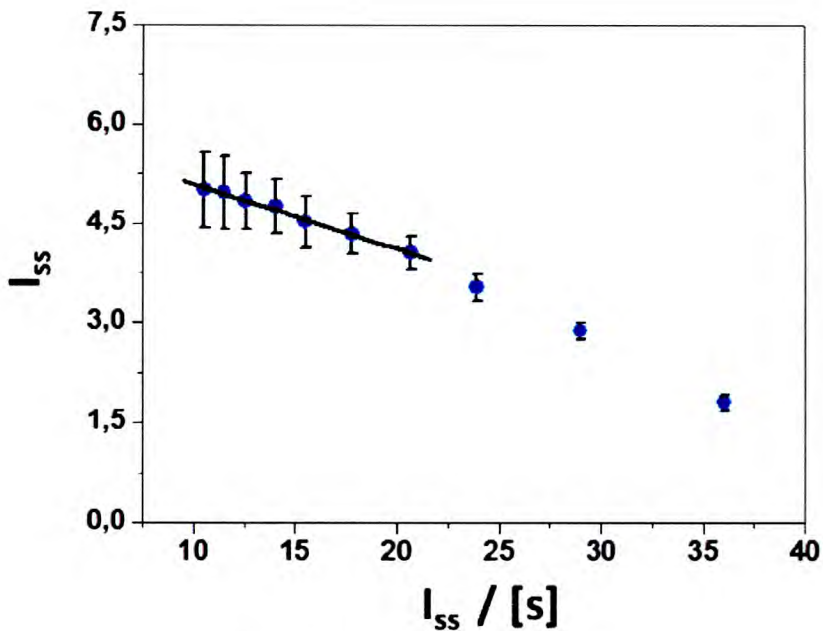


Figura 3. Diagrama de Eadie-Hofstee.

4. Biomoléculas empleadas

4.1. Glucosa oxidasa

A continuación se describirán las características generales de glucosa oxidasa (β -D-glucosa:oxígeno 1-óxidoreductasa, EC 1.1.3.4, GOx) debido a que en este trabajo de tesis se desarrollaron biosensores enzimáticos amperométricos para glucosa a partir de la inmovilización de esta enzima.

GOx es una proteína dimérica de forma elipsoidal compacta con un peso molecular de 160 kDa, siendo sus dimensiones de 7,0 x 5,5 x 8,0 nm aproximadamente. Esta enzima está compuesta por dos monómeros, cada uno de ellos contenteniendo como cofactor un grupo flavina adenina dinucleótido (FAD). El grupo FAD no está unido covalentemente y puede ser liberado desde la holoenzima por desplegamiento parcial. La enzima se encuentra glicosilada, conteniendo un 16 % P/P de carbohidratos totales, compuestos en un 80 % P/P por residuos manosa. Es posible obtenerla de diversas fuentes, aunque la más conocida es del hongo *Aspergillus niger* [39]. La **Figura 4** muestra un esquema de la estructura de GOx.

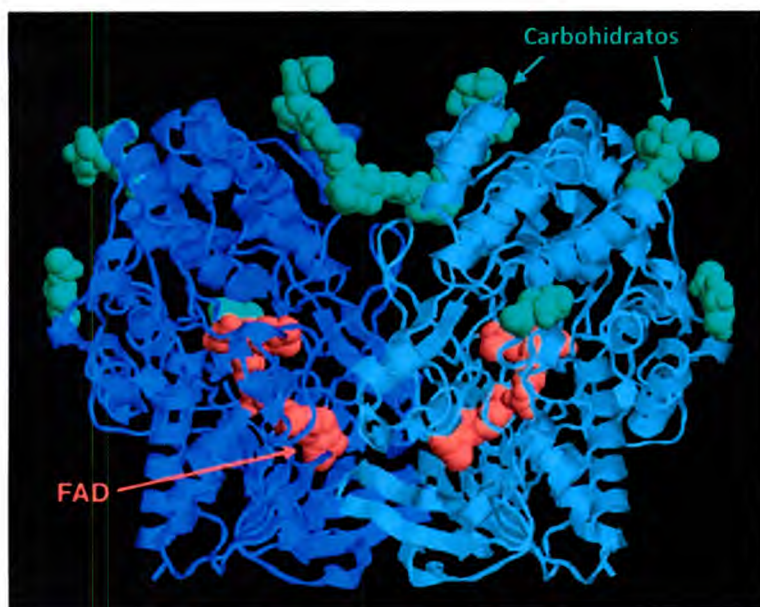


Figura 4. Estructura de GOx

GOx cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono-1,5-lactona utilizando FAD como aceptor de electrones, el cual se reduce a FADH₂. Seguidamente, el oxígeno molecular, regenerador natural del cofactor, es reducido a peróxido de hidrógeno a partir de los electrones provenientes de la oxidación del FADH₂. En la **Figura 5** se puede observar el esquema de la reacción catalítica mediada por GOx [39–41].

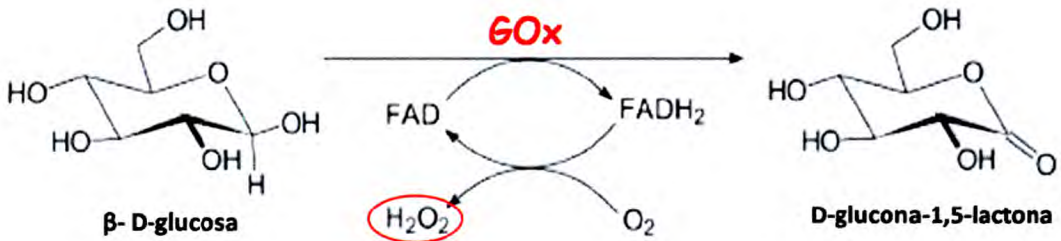


Figura 5. Reacción catalizada por GOx

El peróxido de hidrógeno generado a partir de la oxidación de glucosa, se ha utilizado como indicador de la reacción en los métodos enzimático-colorimétricos empleados en la bioquímica clínica y en los biosensores amperométricos de primera generación. En el primer caso, dicha especie reacciona catalíticamente con cromógenos por medio de una peroxidasa y en el segundo, es oxidado o reducido sobre una superficie electródica, registrando la corriente del proceso, la cual es proporcional a la concentración de glucosa en el medio [39–41].

4.2. Otras proteínas empleadas

En este trabajo se emplearon otras proteínas dispersas en compósitos de grafito modificados con nanopartículas de magnetita. En la **Tabla 3** se muestran las características generales de dichas macromoléculas.

Proteína	PM (KDa)	Características estructurales	Función biológica
Albúmina sérica bovina [42, 43]	66,4	Globular y monomérica. Presenta una superficie hidrofílica con grandes bolsillos hidrofóbicos distribuidos asimétricamente en la molécula. Cadena aminoacídica compuesta por 581 unidades. No posee carbohidratos en su estructura y su forma es elipsoidal compacta de 4 x 14 nm.	Mantenimiento de la presión osmótica del plasma sanguíneo. Transporte de moléculas liposolubles pequeñas.
Insulina porcina [44]	5,9	Estructura lineal y predominio de carácter hidrofílico. Formada por dos cadenas polipeptídicas de 21 y 30 aminoácidos unidas por dos puentes disulfuro. En el organismo es almacenada en forma de hexámero a partir de la interacción no covalente entre las moléculas de proteína.	Hormona anabólica.
Caseína bovina [45]	22-28	Moléculas globulares anfipáticas. Fosfoproteínas asociadas al calcio clasificadas en cuatro grandes grupos de acuerdo a su movilidad electroforética: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína. En la leche se encuentran asociadas entre sí a partir de interacciones hidrofóbicas formando una suspensión coloidal de partículas esféricas (micelas) de un diámetro de entre 50 y 500 nm. Estas micelas a su vez, se encuentran constituidas por submicelas de un diámetro de entre 10 y 20 nm.	Transporte de Ca y P de forma soluble a los lactantes.
Ovolisozima [46]	14,7	Estructura globular formada por una cadena de 129 aminoácidos. Posee un núcleo hidrofóbico pequeño. Cuatro puentes disulfuro contribuyen a la estabilidad de su estructura.	Acción antibacteriana (hidrólisis de peptidoglicanos).
Mucina estomacal porcina [47]	546	Forma de "pesa" (lineal) con más de 65 nm de largo y de fuerte predominio hidrofílico. Es una glicoproteína que consta de un núcleo central polipeptídico lineal (apomucina) rodeado de una porción externa altamente glicosilada. En sus dos extremos la apomucina forma un glóbulo hidrofóbico de 20 nm de diámetro aproximadamente.	Lubricación, viscosidad y excreción microbiana.

Tabla 3. Principales características de las proteínas empleadas.

5. Nanomateriales

El término “nanomateriales” abarca todos aquellos materiales que poseen al menos una dimensión en la escala nanométrica, siendo ésta, entre 1 y 100 nm. El desarrollo de estas nanoestructuras supone no sólo una gran novedad, sino también desafíos respecto al conocimiento y comprensión de las diferentes propiedades físicas y químicas que presentan en relación al mundo macroscópico. A esta escala, las propiedades de la materia están relacionadas directamente con sus dimensiones, dependiendo de cómo se encuentran ordenados sus átomos constituyentes y de qué forma son compartidos sus electrones móviles en el seno del mismo. En este aspecto para dimensiones menores a los 100 nm, las leyes de la física clásica no explican el comportamiento de la materia y es la mecánica cuántica la que toma partido. La otra característica de estos materiales es que presentan una relación entre superficie expuesta y volumen muy superior a la que se encuentra macroscópicamente, la cual favorece la interacción con el entorno [9].

En estos últimos años, la nanotecnología ha impactado prácticamente en todos los sectores socio-económicos. El sector salud está obteniendo resultados promisorios como el desarrollo de biosensores, ingeniería de tejidos, liberación controlada y dirigida de fármacos y agentes de contraste para el diagnóstico por imagen entre otras aplicaciones. También se observan notables avances en la industria de la alimentación, generación de energía, cosmética, textil, tratamiento de aguas residuales, componentes de adhesivos, aditivos para la industria entre otros [9, 45].

En este trabajo de tesis se emplearon nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y grafeno (Gr) con el objeto de desarrollar (bio)sensores electroquímicos mediante su incorporación en compósitos de grafito y aceite mineral. A continuación estos nanomateriales son descritos junto a una breve reseña acerca de las diversas metodologías de síntesis.

5.1. Nanopartículas de magnetita

5.1.1. Características generales

Este compuesto, también conocido como piedra imán, es un óxido de hierro mixto donde coexisten Fe^{+2} y Fe^{+3} . Se trata de un mineral ferri o ferromagnético que pertenece al grupo de materiales de ferrita espinela (MFe_2O_4) [49]. En la estructura cúbica de estos óxidos se encuentra el doble de sitios catiónicos octaédricos respecto de los tetraédricos. Si los cationes M^{+2} ocupan únicamente los sitios tetraédricos se trata de una espinela directa y si sólo se encuentran en los octaédricos es una espinela inversa. Este último es el caso de Fe_3O_4 , ya que a temperatura ambiente, los 16 sitios octaédricos de la celda unidad están ocupados por igual número de cationes de Fe trivalentes y divalentes distribuidos aleatoriamente, mientras que los 8 sitios tetraédricos restantes son ocupados por los cationes Fe^{+3} [50]. El comportamiento magnético que presenta este óxido es debido a sus iones Fe localizados en la red cristalina. El momento magnético provocado por los electrones desapareados de Fe^{+3} en los sitios tetraédricos es de la misma intensidad pero de sentido contrario al generado por estos mismos cationes ubicados en los sitios tetraédricos, por lo que son cancelados entre ellos. De esta forma, el magnetismo en este material proviene del Fe^{+2} que ocupa los sitios octaédricos de la espinela. Es importante destacar, también, que a temperatura ambiente Fe_3O_4 es un conductor electrónico pobre [3,4].

Fe_3O_4 se encuentra en la naturaleza en las rocas ígneas como así también en las bacterias, aves migratorias, abejas y salmónes en los que sirve como medio de orientación [6, 7], y en el cerebro humano [55].

Las nanopartículas de Fe_3O_4 han sido extensamente estudiadas y algunas de sus potenciales aplicaciones ya están en el mercado. Se las utiliza como agente de contraste en las imágenes de resonancia magnética [5, 6], almacenamiento de información [58–60], refrigeración magnética, tintas de impresoras [61] entre otras aplicaciones. También se utilizan en el diagnóstico y tratamiento clínico ya que se emplean como transportadores de biomoléculas [62–65] en la liberación controlada de drogas [66–68] y en la terapia hipertérmica en la lucha contra el cáncer [65, 69, 70].

En la gran mayoría de estas aplicaciones existe cierto requerimiento específico del tamaño de partícula. Por ejemplo, para aplicaciones biomédicas es necesario que el particulado sea lo suficientemente pequeño como para permitir una suspensión coloidal de las mismas y a la vez sean estables en medio acuoso y a pH fisiológico. También se requieren nanopartículas suficientemente grandes para permitir una eficiente separación de drogas o para la producción de calor bajo un campo magnético alterno en el tratamiento por hipertermia [65].

5.1.2. Síntesis de magnetita

Debido a su importancia tecnológica y médica, la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 ha sido estudiada intensamente en los últimos años. Para la aplicación de este nanomaterial es necesario contar con una distribución de tamaño de partículas homogénea, con el objeto de obtener propiedades fisicoquímicas uniformes. Sin embargo, producir nanopartículas de tamaño controlado, con una uniformidad poblacional aceptable y sin agregación interpartículas es una cuestión problemática y dificultosa [52]. Existen diversos métodos de síntesis de estas nanopartículas, sin embargo todos ellos presentan inconvenientes importantes. Uno de estos es la falta de control y la gran polidispersión poblacional en los tamaños de las nanopartículas obtenidas. El otro problema que se presenta es el fuerte efecto de agregación de las partículas que da lugar a la formación de *clusters*, debido a las importantes interacciones magnéticas entre las nanopartículas de Fe_3O_4 .

Es importante destacar que estas nanopartículas no son estables químicamente ya que en condiciones ambientales se oxidan fácilmente a maghemita y en medio ácido se disuelven. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias eficaces para mejorar la estabilidad química de estas nanopartículas magnéticas [71]. A partir de la utilización de estabilizantes orgánicos e inorgánicos es posible evitar este tipo de interacción entre las partículas magnéticas. De esta forma, las nanopartículas son protegidas individualmente además de ser más fácilmente dispersables debido a su revestimiento químico que minimiza la agregación y oxidación. Estas moléculas de dispersante cubren de manera compacta la superficie de las nanopartículas a partir de un anclaje

químico o adsorción física, y por medio de fuerzas de repulsión electrostática y estérica logran minimizar la interacción entre ellas permitiendo la estabilización de las dispersiones coloidales [71].

La superficie de los nanocristales de Fe_3O_4 puede ser modificada durante o después de la síntesis con surfactantes como el ácido láurico [72] o heptanoico [73], como así también mediante la utilización de polímeros como carboximetilcelulosa [74], polietilenglicol [75], polivinilalcohol [76], ácido poliacrílico [77], entre otros. En este mismo sentido se ha demostrado que cuando las nanopartículas de Fe_3O_4 son tratadas con FeCl_3 , se obtiene una mejor dispersión de las mismas, debido a que el catión trivalente es adsorbido fácilmente sobre la superficie del nanocristal para formar un revestimiento de cargas positivas [78]. Diversos trabajos demuestran una correlación directa entre la concentración de estos estabilizantes y la obtención de poblaciones monodispersas de nanomaterial. También se observa que a una mayor concentración de dispersante utilizado en la síntesis, se obtienen menores tamaños de nanopartículas [52, 81, 82].

A continuación se describen brevemente los métodos de síntesis más comúnmente utilizados:

- **Coprecipitación:** es el método convencional para obtener nanopartículas de Fe_3O_4 en un rango variable de tamaño, de 5 a 100 nm de diámetro. Para obtener el producto se agrega gota a gota una solución amoniacal acuosa a otra solución conteniendo Fe^{+2} y Fe^{+3} en una relación molar de 2:1, agitando vigorosamente o aplicando ultrasonido. Es necesario mantener el pH del medio en un rango de 11-12. Los factores de control del tamaño de la nanopartícula son la concentración de sus precursores en la solución y la velocidad de precipitación. Respecto de la forma de la partículas, ésta dependerá de los aniones de las sales precursoras presentes en el medio de reacción (Cl^- , SO_4^{-2} o NO_3^-).

- **Descomposición térmica:** los nanocristales son obtenidos a partir de compuestos organometálicos en solventes orgánicos en condiciones de ebullición y en presencia de surfactantes estabilizadores. Para el control del tamaño y la morfología es muy importante la relación de los reactantes con el medio orgánico y los surfactantes

empleados en la síntesis, como así también la temperatura y el tiempo de reacción. Se obtienen nanopartículas en el rango de diámetros entre 3 y 50 nm [71, 81].

- **Microemulsión:** una microemulsión es una dispersión termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, donde los microdominios de ambos componentes o uno de ellos son estabilizados interfacialmente a través de una película de surfactantes. El tamaño del microdominio es controlado a partir de la relación molar entre el surfactante y el agua. En este sentido, a partir de la dispersión y estabilización de microgotas de agua en un líquido inmiscible, este sistema es utilizado como un nanoreactor para la producción de nanopartículas de Fe_3O_4 . Las características de las partículas producidas son fuertemente dependientes del tipo de surfactante utilizado permitiendo cierta versatilidad [71, 82].

- **Sonoquímica:** las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas son obtenidas a partir de acetato ferroso como precursor, presentando tamaños del orden de los 10 nm. La reacción comienza a partir de la aplicación del ultrasonido, con la formación de especies radicalarias provenientes de la molécula de agua como $\cdot\text{H}$ y $\cdot\text{OH}$ para generar H_2O_2 . Este último luego iniciará la oxidación de Fe^{+2} para formar $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y finalmente Fe_3O_4 [83, 84].

- **Síntesis hidrotérmica:** la estrategia sintética se basa en la reacción que ocurre a partir de la transferencia de los reactivos entre dos interfases líquido-sólido diferentes. La síntesis hidrotérmica por reducción comienza cuando FeCl_3 , etilenglicol, acetato de sodio y polietilenglicol son mezclados y calentados a 473 K en un rango de 8 a 72 hs. En esta mezcla el etilenglicol es utilizado como agente reductor y para prevenir la agregación de las nanopartículas; y el acetato de sodio como estabilizante electrostático. Se obtienen partículas esféricas del orden de los 200 a 800 nm [71].

- **Síntesis electroquímica:** en la búsqueda de nuevos métodos alternativos que minimicen la polidispersidad en el tamaño, la agregación y la presencia de impurezas, la síntesis por vía electroquímica ha surgido como una opción a los métodos convencionales de generación de nanopartículas de Fe_3O_4 [71, 81, 83, 84]. La formación de las nanopartículas ocurre en la interfase electrodo/solución quedando de esta forma el producto depositado como una fina película sobre el electrodo. Se trata

de una reacción de oxidación o reducción que puede ser controlada termodinámica y cinéticamente a partir del potencial o la densidad de corriente aplicados a la celda de reacción, respectivamente. En este aspecto, ajustando ambos parámetros, es posible lograr un mayor control en los tamaños de las nanopartículas, obteniendo poblaciones monodispersas y con alta pureza [52].

Por otro lado, la composición de esta película superficial puede ser estudiada variando el pH como así también la naturaleza y concentración de la solución electrolítica. Con el objeto de controlar el tamaño, agregación, estabilidad y morfología de las nanopartículas generadas también se utilizan ligandos, polímeros y surfactantes como estabilizantes y moldeadores de forma [31, 36]. Es importante destacar que a partir de la modificación superficial de este nanomaterial es posible la funcionalización con biomoléculas de interés clínico. A diferencia del resto de los métodos antes mencionados, mediante la vía electrosintética es posible lograr específicamente tamaños entre 20 y 30 nm [86]. Pensando en las posibles aplicaciones en medicina, estas dimensiones son las adecuadas para que la introducción en el torrente sanguíneo de Fe_3O_4 sea efectiva y así, el nanomaterial funcionalizado alcance su objetivo antes de que sean eliminados por las vías fisiológicas, ya que tamaños de nanopartículas más grandes provocarían intoxicación por acumulación en hígado [87].

En la síntesis electroquímica las temperaturas de reacción necesarias no son tan altas como en la vía hidrotérmica o la descomposición térmica, sino que más bien este parámetro experimental es dependiente del punto de ebullición de la solución electrolítica. Además, el arreglo experimental y los instrumentos para realizarla son de bajo costo y fácilmente accesibles [52, 86]. Es importante mencionar que las características de los productos de escala nanométrica provenientes de una electrosíntesis dependen de una cuidadosa elección de las variables experimentales antes mencionadas [89].

En la **Tabla 4** se presentan las ventajas y desventajas de los cinco métodos mencionados anteriormente. Se observa que, en lo que refiere a practicidad, simplicidad y rapidez, la vía sintética por coprecipitación es la ideal aunque posee como desventaja los residuos básicos de la síntesis, la fuerte agregación y el bajo control de la forma de las nanopartículas. El mejor método con el que se puede

controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas es por descomposición térmica. De manera alternativa, es posible lograr poblaciones monodispersas y control morfológico de las partículas a partir de la vía sintética por microemulsión, pero ésta presenta un muy bajo rendimiento y se requieren grandes cantidades de solventes y reactivos tóxicos. La menos explorada de todas las síntesis es la hidrotérmica, ésta posee como ventaja la utilización de agua como solvente. Por medio de esta síntesis es posible obtener las nanopartículas más grandes y representa además otra opción en lo que refiere a un mejor control de tamaño y forma de los nanocristales. Por otro lado, si bien la vía sintética por sonoquímica también es una de las más simples aunque las altas velocidades de las partículas generadas por el ultrasonido dan como resultado colisiones entre las mismas, provocando agregación y bajo control morfológico de las nanopartículas obtenidas [52, 71].

Sobre la base de lo discutido anteriormente, es posible afirmar que entre las alternativas más versátiles y ecológicas, la metodología de síntesis electroquímica resulta ser la que presenta el mejor compromiso entre el control morfológico, distribución de tamaños y estabilidad. Particularmente, en este trabajo de tesis se utilizaron nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas a partir de un electrodo de sacrificio como fuente principal de material para generarlas y en presencia de un surfactante amoniacal como electrolito soporte y como agente de recubrimiento [52]. En la **Figura 6** se muestra esquemáticamente la estructura de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas en presencia de un surfactante.

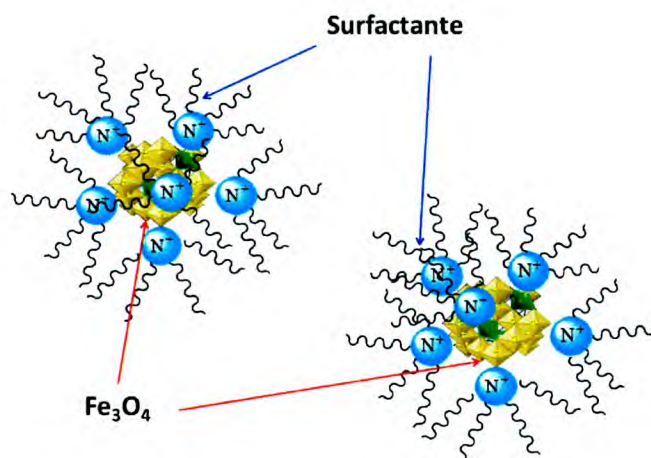


Figura 6. Estructura de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas

Método sintético	Complejidad/ requerimientos	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción	Solvente	Intervalo de tamaños posibles a obtener (nm)	Polidispersión poblacional de los tamaños	Control morfológico de las nanopartículas	Rendimiento
Coprecipitación	Muy simple/ control del pH	20-29	Minutos	Agua	5-100	Relativamente reducida	Malo	Alto y escalable
Descomposición térmica	Compleja/ atmósfera inerte	100-320	Horas a días	Orgánico	3-5	Muy reducida	Muy bueno	Alto y escalable
Microemulsión	Compleja/ altas cantidades de solvente	20-50	Horas	Orgánico	2-15	Relativamente reducida	Bueno	Bajo
Sonoquímica	Simple/ deoxigenación	25-90	Minutos	Agua	~ 10	Relativamente reducida	Bajo	Alto
Hidrotérmica	Simple/ altas presiones	220	Horas a días	Agua/ alcohol	200-800	Muy reducida	Muy bueno	Medio
Electroquímica	Simple/ celda electroquímica	25-90	Minutos	Agua	20-30	Reducida	Muy bueno	Alto

Tabla 4. Características generales de los métodos más comúnmente utilizados para la generación de nanopartículas de Fe_3O_4 .

5.2. Grafeno

5.2.1. Características generales

El grafeno (Gr) es una de las formas alotrópicas del carbono junto al grafito, el diamante, los fullerenos y los nanotubos de carbono. Se trata de una lámina bidimensional de una monocapa de átomos de carbono con hibridación sp^2 . También es posible considerarlo como una molécula aromática infinitamente grande siendo el caso límite de la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos planos [89]. Desde su descubrimiento en el año 2004, que les valió el premio nobel a Geim, Novoselov y colaboradores [90], este material ha recibido gran atención debido a sus excepcionales propiedades físicas, tales como una alta conductividad electrónica, buena estabilidad térmica y una resistencia mecánica alrededor de 200 veces más fuerte que el acero. También es un material flexible, transparente e impermeable ya que ni siquiera el helio, el átomo gaseoso más pequeño, puede atravesarlo. Como el resto de los nanomateriales, sus propiedades dependen en gran medida de su estructura, siendo ésta una particularidad del Gr ya que a diferencia de otros nanomateriales, como por ejemplo las nanopartículas, todos sus átomos son constituyentes superficiales [91]. La alta conductividad electrónica de este nanomaterial es atribuida principalmente a los enlaces π deslocalizados por encima y por debajo de la lámina monoatómica y a su gran área específica ($2830 \text{ m}^2/\text{g}$) [91, 92]. En la **Figura 7** se muestra la estructura reticular del Gr.

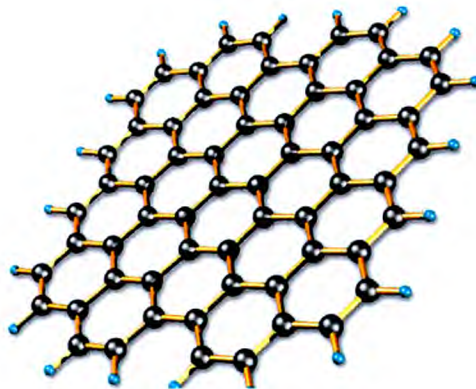


Figura 7. Estructura del grafeno.

Debido a las propiedades antes mencionadas, el Gr posee un gran potencial para transformar y revolucionar muchos campos de aplicación del mundo moderno. Las investigaciones más relevantes se encuentran dirigidas hacia la producción y almacenamiento de energía (paneles solares, supercapacitores, celdas de combustibles, baterías) [93–95], fabricación de circuitos integrados más eficientes en la industria electrónica, en reemplazo del silicio [96, 97], generación de nuevos materiales [98–101], y en la biotecnología y áreas relacionadas como es el caso de los (bio)sensores [102–108].

Desde el punto de vista de su comportamiento electrónico y electroquímico, en el Gr existen principalmente dos superficies que participan en la transferencia electrónica heterogénea: el plano basal y los bordes de las láminas. Se ha demostrado que la transferencia electrónica heterogénea de una red de átomos de carbono con hibridación sp^2 es realizada sobre los defectos de borde de red y no a través de la lámina plana del Gr [109]. El excelente comportamiento electroquímico del Gr indica que este material resulta sumamente prometedor para su aplicación en electroanálisis, como lo demuestra el asombroso número de publicaciones en estos últimos años [102–105]. Una consideración importante para la aplicación práctica del Gr en electroquímica es que su gran superficie específica conduciría a electrodos más resistentes a la pasivación en comparación con otros de naturaleza carbonácea. Esto último implica una mejor estabilidad y rendimiento del sistema electroquímico [110].

5.2.2. Síntesis del grafeno

Una de las características destacables de este nanomaterial es su costo de producción relativamente bajo en comparación, por ejemplo, con los nanotubos de carbono. Además, con este material se evita la presencia de impurezas como las partículas metálicas catalíticas encontradas en los nanotubos de carbono, provenientes de su síntesis [111]. Esto último hace del Gr una interesante alternativa para su aplicación en el desarrollo de dispositivos electrónicos y (bio)sensores electroquímicos. Sin embargo, el principal obstáculo en la actualidad es que aún no es posible fabricar Gr a gran escala [92].

En términos generales, el Gr y los nanomateriales derivados pueden ser preparados en sentido “*top-down*”, es decir a partir de la descomposición de estructuras más grandes, principalmente el grafito. Por otro lado, también es posible generar estas nanoestructuras a partir de la síntesis de tipo “*bottom up*” o ascendente, donde las láminas del Gr se sintetizan generalmente a partir de un hidrocarburo gaseoso como por ejemplo el metano [110].

La variedad de métodos de síntesis se puede dividir de acuerdo a su naturaleza en dos categorías principales, física y química.

5.2.2.1. Síntesis física

- **Descamación mecánica del grafito altamente ordenado con una cinta adhesiva.** Es una forma sencilla para obtener Gr ya que en el grafito las láminas apiladas se encuentran interaccionando unas con otras a través de fuerzas de van der Waals. También es posible hacerlo a partir del grafito natural (minas) o del grafito sintético. El método que utilizaron Geim y Novoselov [90] para aislarlo por primera vez fue utilizando una cinta adhesiva, mediante exfoliación mecánica del grafito. Esta estrategia sintética puede servir para algunos estudios experimentales, sin embargo no es un método válido para escalar a nivel industrial [92].

- **Crecimiento epitaxial de láminas de Gr sobre un soporte sólido:** El crecimiento de láminas de Gr es una alternativa a la exfoliación mecánica. Es posible obtener grandes láminas de Gr epitaxial de unos cuantos micrómetros. Es importante mencionar que muchas propiedades del nanomaterial han sido identificadas al producirlo con este método [92]. El mismo consiste en calentar carburo de silicio (SiC) a temperaturas mayores que 1100 °C para producir Gr sobre un sustrato metálico como Pt o Ni [112–114].

- **Deposición química de vapor:** a través de esta metodología es posible producir suficiente nanomaterial para su aplicación en la electroquímica convencional, donde se requieren en general grandes cantidades. También es posible obtener una o varias láminas. Este método es utilizado para hacer crecer catalíticamente, a altas temperaturas, las láminas de Gr sobre una superficie metálica policristalina de Ni o Cu

a partir del flujo gaseoso de H_2 e hidrocarburos como fuente de carbono, siendo el metano el más utilizado [115–117].

5.2.2.2. Síntesis química

- **Intercalado laminar del grafito:** es posible intercalar las láminas de Gr en el grafito con moléculas pequeñas para luego ultrasonicar con el objeto de exfoliarlas. Debido a que las láminas de Gr tienden a apilarse a partir de interacciones tipo van der Waals es necesario estabilizarlas con un surfactante [118]. Una alternativa promisoría es la intercalación de dichas láminas con iones litio. Esta intercalación también puede realizarse en los nanotubos de carbono de pared múltiple, generándose un incremento en el espaciado entre sus láminas enrolladas y consecuentemente, la ruptura longitudinal de los nanotubos para producir nanocintas individuales de Gr [119, 120]. Alternativamente, también se ha demostrado que es posible desplegar a los nanotubos de pared múltiple en forma similar, utilizando permanganato de potasio para obtener, en este caso, nanocintas de Gr apiladas [121].

- **Oxidación química, dispersión y reducción:** por medio del método de Brodie el grafito es oxidado en ácido nítrico para producir óxido de grafito y posteriormente descompuesto térmicamente en atmósfera inerte. Esta descomposición debe hacerse bajo condiciones de *shock* térmico a través de una rampa de temperatura (cientos de °C por minuto) para permitir la rápida evolución de los gases y consecuente separación física de las láminas de óxido de grafeno (GrO) [122]. Otra alternativa para obtener GrO es utilizando el método de Hummers, en el que el grafito es oxidado a partir de una mezcla concentrada de ácido nítrico, sulfúrico y clorato de potasio [123]. El GrO resultante es sonicado para exfoliar completamente las láminas y seguidamente reducido químicamente por algún compuesto como la hidracina o el ácido ascórbico. Debe tenerse en cuenta que más del 99% de los nanomateriales obtenidos con los dos métodos anteriores tienen una estructura de tipo multilaminada (plaquetas de Gr) [118].

Sobre la base de las dos categorías principales de síntesis del Gr, los métodos físicos desarrollados hasta el momento para producirlo como la deposición de vapor químico

o la exfoliación mecánica del grafito presentan como desventaja que no son fácilmente escalables. Además, muchas veces se requieren protocolos de producción complejos y poco accesibles. Por otro lado, sus productos carecen en su estructura reticular de defectos o funcionalidades oxigenadas que, como ya se mencionó son importantes desde el punto de vista electroquímico [109]. Es por esto que generalmente para producir este nanomaterial y sus derivados a gran escala se utiliza la oxidación química y subsiguiente exfoliación térmica o ultrasónica del óxido de grafito conduciendo al GrO.

El GrO es un mal conductor electrónico, por lo tanto se requiere necesariamente de su reducción (por vía química o electroquímica) para la mayoría de las aplicaciones electroquímicas. Se ha demostrado que la conductividad del Gr proveniente de la reducción electroquímica del GrO (R-GrO) es incrementada en una magnitud de ocho veces respecto del material de partida [110, 124]. El GrO posee una estructura que no es completamente plana sino más bien de esqueleto de carbono plegado o corrugado debido a que la red se encuentra fuertemente dañada por las funciones oxigenadas presentes, ya que existe una disminución importante en la proporción de átomos de carbono con hibridación sp^2 . Los grupos oxigenados que se encuentran mayormente en la estructura de GrO son hidroxilos, epóxidos, cetonas, carboxilatos, ésteres, etc [111].

En este trabajo de tesis se utilizó el método de Hummers modificado como estrategia sintética para producir GrO y una posterior reducción química del nanomaterial utilizando ácido ascórbico, con el objetivo de desarrollar un sensor electroquímico para dopamina. En el capítulo II se explicará con mayor detalle las distintas etapas.

A partir del método de Hummers se produce una cantidad importante de sedimento de GrO. En la **Figura 8** se esquematiza la oxidación química del grafito para dar agregados de láminas de GrO con distintos grados de funcionalización oxigenada. Esta oxidación diferenciada entre las láminas se debe a que en el grafito, las mismas se encuentran apiladas debido a la fuerte interacción hidrofóbica, encontrándose más protegidas las capas internas que las externas [118].

Este sedimento, luego de ser filtrado, es sometido al ultrasonido con el objeto de exfoliar las láminas de GrO. Como consecuencia de esto último y debido a que presentan un mayor carácter hidrofílico que sus predecesoras en el grafito, es posible generar fácilmente una suspensión coloidal de láminas con dimensiones laterales del orden de unos pocos a cientos de micrómetros [118, 125]. Seguidamente, estas láminas son expuestas a un medio reductor con ácido ascórbido para obtener R-GrO.

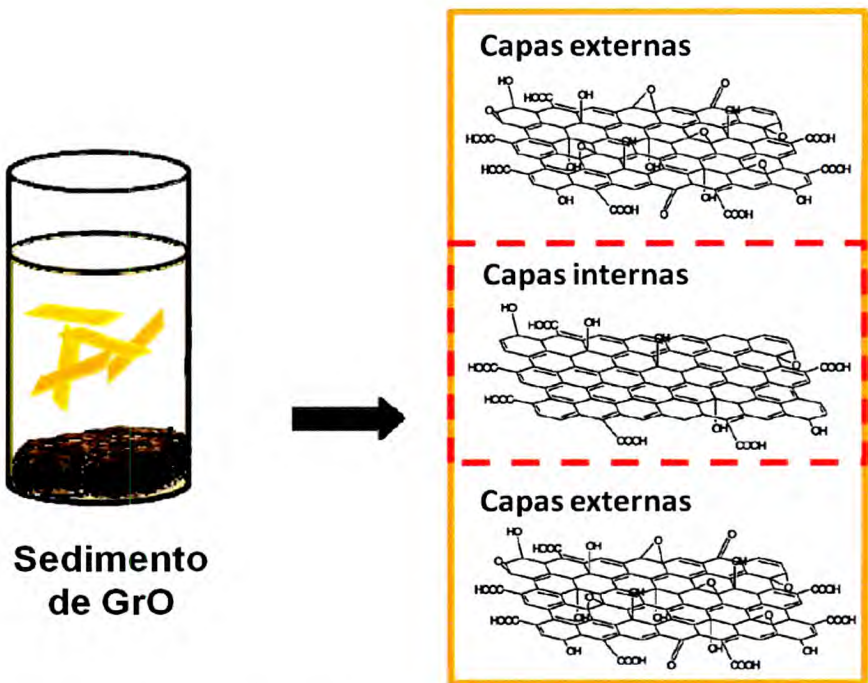


Figura 8. Esquemización de la oxidación química del grafito para producir GrO a partir del método de Hummers.

El R-GrO es también conocido como "lámina de Gr funcionalizada", ya que es importante tener en cuenta que lo que se genera no es Gr, sino más bien una estructura reticular aromática restaurada en forma parcial. Luego del tratamiento reductor persisten abundantes defectos y grupos oxigenados funcionales, sobre todo en los bordes de la estructura. En este aspecto, R-GrO difiere significativamente de la estructura reticular hexagonal perfecta del Gr mostrado en la **Figura 7**, lo cual resulta ventajoso desde el punto de vista de la actividad electrocatalítica. Una alta proporción de defectos de borde oxigenados está asociada a una rápida transferencia electrónica.

Por otra parte, estos grupos oxigenados favorecen también la unión covalente de (bio)moléculas al nanomaterial para así lograr nuevos materiales híbridos para el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos [92, 109].

Otro aspecto muy importante a destacar respecto de estas funcionalidades oxigenadas y su relación directa con los procesos superficiales electroquímicos, es su influencia en la adsorción o desorción sobre un electrodo. Se ha demostrado que la adsorción de moléculas catiónicas como dopamina y NAD^+ sobre electrodos modificados con R-GrO, es debida a la presencia de grupos oxigenados en los bordes o en los defectos de borde, principalmente carboxilatos [126, 127]. Esta característica tiene que ser abordada de manera particular para cada sistema, ya que si bien los productos de una reacción electroquímica pueden ser adsorbidos y por ende pasivar la superficie electródica, tal adsorción puede ser aprovechada, por ejemplo con fines analíticos para mejorar el desempeño de un (bio)sensor [110].

En la **Figura 9** se muestra la reacción de reducción de GrO para restablecer parcialmente la estructura aromática y generar R-GrO. Es importante destacar que, a los fines de una mejor visualización, sobre todo para GrO, no se muestra la orientación estérica de las funcionalidades oxigenadas ni la estructura de carbono esquelética de tipo plegada. En términos generales, las propiedades de estos materiales dependerán fuertemente de su estructura, siendo la cantidad y posición de los grupos oxigenados determinantes de sus características fisicoquímicas [109, 110].

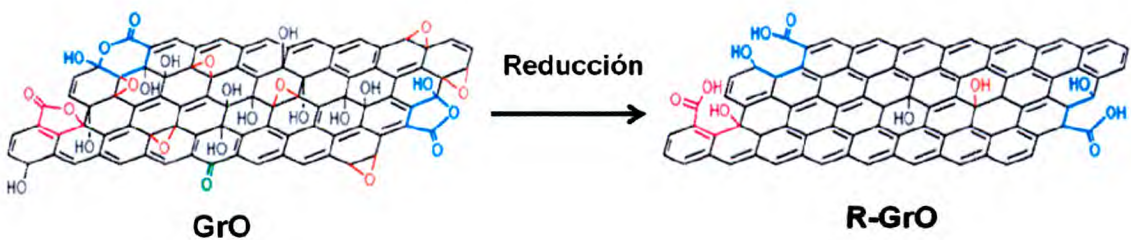


Figura 9. Reducción de GrO a R-GrO. El modelo muestra la presencia de funciones oxigenadas, sin indicar su orientación estérica.

6. Organización y presentación del trabajo de tesis

En el presente trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos a partir del diseño, la caracterización y la optimización de nuevos materiales de electrodos compósitos de grafito basados en el uso de nanopartículas de Fe_3O_4 y Gr con el objetivo de desarrollar biosensores electroquímicos para la cuantificación altamente sensible y selectiva de diversos bioanalitos. En el **capítulo II** se describen las técnicas y metodologías empleadas durante el desarrollo de dicho trabajo de tesis, así como también sus fundamentos para la comprensión de los resultados presentados.

Con el objetivo de desarrollar un transductor sensible y selectivo hacia peróxido de hidrógeno, en el **capítulo III** se presentan los resultados obtenidos acerca de la optimización de una plataforma preparada por dispersión de las nanopartículas electrosintetizadas de Fe_3O_4 en compósitos de grafito. El estudio se basó en el análisis de la respuesta electroquímica de diferentes marcadores rédox a partir de la incorporación de distintas proporciones de nanopartículas de Fe_3O_4 en el compósito.

En el **capítulo IV** se analiza el efecto de la incorporación de distintas proteínas en los compósitos de grafito conteniendo las nanopartículas de Fe_3O_4 electrogeneradas. Se discute el efecto de la relación entre las proporciones de nanopartícula y proteína, así como también la naturaleza estructural de la biomolécula en la dispersión de las nanopartículas en el compósito.

El **capítulo V** presenta el desarrollo de un biosensor amperométrico de glucosa y su aplicación en la cuantificación de este analito en muestras reales como el suero sanguíneo humano. Este bioelectrodo fue desarrollado a partir de la combinación de GOx y el transductor electroquímico optimizado en el capítulo III. En este sentido, se realizaron estudios del efecto de la proporción de GOx en los parámetros analíticos del biosensor, como así también de interferencia y estabilidad del biosensor.

A partir de una alternativa de síntesis más accesible y ecológica de grafeno, el **capítulo VI** describe la aplicación de un novedoso material compósito conteniendo dicho nanomaterial en su matriz, con el objetivo de determinar electroanalíticamente dopamina en presencia de interferentes.

Finalmente, en el **capítulo VII** se presentan las conclusiones generales del trabajo de tesis.

7. Bibliografía

- [1] L. C. Clark, C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 102, pp. 29–45, 1962.
- [2] J. H. T. Luong, K. B. Male, J. D. Glennon, "Biosensor technology: technology push versus market pull," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, Nro. 5, pp. 492–500, 2008.
- [3] A. Hulanicki, S. Geab, and F. Ingman, "Chemical Sensors: Definitions and Classification," *Int. Union Pure Appl.*, vol. 63, no. 9, pp. 1247–1250, 1991.
- [4] J. Janata, "Introduction: Modern topics in chemical sensing," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 2, pp. 327–8, 2008.
- [5] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, "Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 121–131, 2001.
- [6] J. M. Pingarrón, P. S. Batanero, *Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid, España: Síntesis, 1999.
- [7] B. R. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*. New York, USA: John Wiley, 2002.
- [8] I. Palchetti, M. Mascini, D. Chimica, V. Lastruccia, "Sensors and Microsystems," vol. 54, pp. 15–23, 2010.
- [9] A. M. Pisoschi, "Biosensors as bio-based materials in chemical analysis: A review," *J. Biobased Mater. Bioenergy*, vol. 7, Nro. 1, pp. 19–38, 2013.
- [10] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, vol. 3. New York, USA: John Wiley and Sons, 2000.
- [11] J. D. Newman, S. J. Setford, "Enzymatic biosensors," *Mol. Biotechnol.*, vol. 32, Nro. 3, pp. 249–68, 2006.
- [12] S. M. Borisov, O. S. Wolfbeis, "Optical biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 2, pp. 423–61, 2008.

- [13] X. Chen, Z. Yang, S. Si, "Potentiometric urea biosensor based on immobilization of urease onto molecularly imprinted TiO_2 film," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 635, Nro. 1, pp. 1–6, 2009.
- [14] E. Karakuş, Ş. Pekyardımcı, E. Kılıç, "Potentiometric bienzymatic biosensor based on PVC membrane containing palmitic acid for determination of creatine," *Process Biochem.*, vol. 41, Nro. 6, pp. 1371–1377, 2006.
- [15] R. Koncki, I. Walcerz, F. Ruckruh, S. Glab, "Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination," *Anal. Chim. Acta*, vol. 2670, Nro. 96, pp. 215–222, 1996.
- [16] A. J. Lawrence, "Conductimetric enzyme assays," *Eur. J. Biochem.*, vol. 18, Nro. 2, pp. 221–225, 1971.
- [17] J. S. Taylor, R.F. Schultz, *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, Institute . Bristol y Philadelphia, United Kingdom: IOP Publishing Ltd, 1996.
- [18] J. Cunningham, *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York, USA: John Wiley, 1998.
- [19] L. A. Francis, J. Friedt, C. Zhou, P. Bertrand, C. De Louvain, C. Sud, "In Situ Evaluation of Density , Viscosity , Thickness of Adsorbed Soft Layers by Combined Surface Acoustic Wave and Surface Plasmon Resonance of acoustic and optical methods for the in situ quantitative," *Anal. Chem.*, vol. 78, Nro. 12, pp. 4200–4209, 2006.
- [20] M. D. Rubianes, A. S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, G. Rivas, "Carbon nanotubes paste electrodes modified with a melanic polymer: Analytical applications for the sensitive and selective quantification of dopamine," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 144, Nro. 1, pp. 274–279, 2010.
- [21] T. Ahuja, I. A. Mir, D. Kumar, Rajesh, "Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications," *Biomaterials*, vol. 28, Nro. 5, pp. 791–805, 2007.
- [22] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, Nro. 3, pp. 489–511, 2012.
- [23] F. R. R. Teles, L. P. Fonseca, "Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, Nro. 8, pp. 1530–1543, 2008.
- [24] G. Decher, J.-D. Hong, "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces," *Macromol. Symp.*, vol. 46, Nro. 1, pp. 321–327, 1991.

- [25] I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, "Carbon paste electrodes in the new millennium," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 7, Nro. 4, pp. 598–656, 2009.
- [26] L. Gorton, "Carbon Paste Electrodes Modified with Enzymes, Tissues, Cells," *Electroanalysis*, vol. 7, Nro. 1, pp. 23–45, 1994.
- [27] H. Wang, Z. Liu, G. Zhang, L. Wang, "Electrochemical detection of trace cadmium in soil using a Nafion/stannum film-modified molecular wire carbon paste electrodes," *Ionics (Kiel)*, vol. 19, Nro. 11, pp. 1687–1693, 2013.
- [28] M. Parvin, M.H Golivand, M.B. Najafi, M. Shariaty, "Carbon paste electrode modified with cobalt nanoparticles and its application to the electrocatalytic determination of chlorpromazine," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 31, Nro. 36, pp. 31–36, 2012.
- [29] P. E. Erden, B. Zeybek, Ş. Pekyardimci, E. Kiliç, "Amperometric carbon paste enzyme electrodes with Fe₃O₄ nanoparticles and 1,4-Benzoquinone for glucose determination," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 41, Nro. 3, pp. 165–171, 2013.
- [30] T. Thomas, R. J. Mascarenhas, B. E. K. Swamy, P. Martis, Z. Mekhalif, B. S. Sherigara, "Multi-walled carbon nanotube/poly(glycine) modified carbon paste electrode for the determination of dopamine in biological fluids and pharmaceuticals," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 110, Nro. 1, pp. 458–465, 2013.
- [31] S. A. Zaidi, "Graphene: A Comprehensive Review on Its Utilization in Carbon Paste Electrodes for Improved Sensor Performances," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 8, pp. 11337–11355, 2013.
- [32] M. Arvand, M. Dehsaraei, "A gold nanoparticles-modified carbon paste electrode for uric acid determination in human urine without pretreatment steps," *Anal. Bioanal. Electrochem.*, vol. 5, Nro. 4, pp. 439–454, 2013.
- [33] S. S. Shankar, B. E. K. Swamy, B. N. Chandrashekar, "Electrochemical selective determination of dopamine at TX-100 modified carbon paste electrode: A voltammetric study," *J. Mol. Liq.*, vol. 168, pp. 80–86, 2012.
- [34] J. Wang, "Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges," *Electroanalysis*, vol. 13, Nro. 12, pp. 983–988, 2001.
- [35] A. Chaubey, B. D. Malhotra, "Mediated biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 17, Nro. 6–7, pp. 441–456, 2002.

- [36] R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. D. Mello, L. T. Kubota, "Review Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, Nro. 2, pp. 230–243, 2003.
- [37] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, J. H. Lee, "Recent advances in graphene-based biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, Nro. 12, pp. 4637–4648, 2011.
- [38] A. Blanco, *Química Biológica*. 2001, p. Séptima edición.
- [39] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg, "Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Angstrom of resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 229, Nro. 1, pp. 153–172, 1993.
- [40] R. Wilson, A. P. F. Turner, "Glucose oxidase: an ideal enzyme," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 7, pp. 165–185, 1992.
- [41] J. H. Pazur, K. Kleppe, A. Cepure, "A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 11, Nro. 2, pp. 351–357, 1965.
- [42] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, "Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 5, pp. 827 – 835, 1998.
- [43] S. K. Swain, D. Sarkar, "Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 286, pp. 99–103, 2013.
- [44] J. P. Cartailier, "The Structure of Insulin," *Beta Cell Biol. Consort.*, pp. 1–2, 2013.
- [45] D. S. Horne, "Casein structure, self-assembly and gelation," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 7, Nro. 5–6, pp. 456–461, 2002.
- [46] B. W. M. Wilson, Keith P., Bruce A. Malcolm, "Structural and Thermodynamic Analysis of Compensating Mutations within the core of Chicken Egg White lysozyme," *JBC*, vol. 267, Nro. 15, pp. 10842–10849, 1992.
- [47] G. E. Yakubov, A. Papagiannopoulos, E. Rat, R. L. Easton, T. A. Waigh, "Molecular structure and rheological properties of short-side-chain heavily glycosylated porcine stomach mucin," *Biomacromolecules*, vol. 8, Nro. 11, pp. 3467–3677, 2007.
- [48] A. Chen, S. Chatterjee, "Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, Nro. 12, pp. 5425–5438, 2013.

- [49] M.-P. Pileni, "Magnetic fluids: Fabrication, magnetic properties, organization of nanocrystals," *Adv. Funtional Mater.*, vol. 11, Nro. 5, pp. 323–336, 2001.
- [50] U. Schwertmann, R. M. Cornell, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurences and Uses, Second Edition*. 2004.
- [51] R. J. Harrison, A. Putnis, "Magnetic properties of the magnetite-spinel solid solution: Saturation magnetization and cation distributions," *Am. Mineral.*, vol. 80, pp. 213–221, 1995.
- [52] L. Cabrera, "Síntesis electroquímica y caracterización de nanopartículas de magnetita. Generación de materiales híbridos," *Tesis Dr. Univ. Autónoma Madrid-Universidad Guanajuato*, 2008.
- [53] V. . Binhi, "Stochastic dynamics of magnetosomes and a mechanism of biological orientation in the geomagnetic field," *Bioelectromagnetics*, vol. 27, Nro. 1, pp. 58–63, 2006.
- [54] W. Solov'yov, I.A., Greiner, "Theoretical analysis of an iron mineral-based magnetoreceptor model in birds," *Biophys. J.*, vol. 93, Nro. 5, pp. 1493–1509, 2007.
- [55] J. L. Kirschvink, A. A Kobayashi-Kirschvink, B. J. Woodford, "Magnetite biomineralization in the human brain," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, Nro. 16, pp. 7683–7687, 1992.
- [56] X. . Ventura, M., Sun, Y., Rusu, V., Laverman, P., Borm, P., Heerschap, A., Oosterwijk, E., Boerman, O.C., Jansen, J.A. , Walboomers, "Dual contrast agent for computed tomography and magnetic resonance hard tissue imaging," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 19, Nro. 6, pp. 405–416, 2013.
- [57] M. B. . Faria, M.R., Cruz, M.M., Gonçalves, M.C., Carvalho, A.d, Feio, G., Martins, "Synthesis and characterization of magnetoliposomes for MRI contrast enhancement," *Int. J. Pharm.*, vol. 446, Nro. 1–2, pp. 183–190, 2013.
- [58] C. Lang, Dirk Schüler, D. Faivre, "Synthesis of Magnetite Nanoparticles for Bio- and Nanotechnology: Genetic Engineering and Biomimetics of Bacterial Magnetosomes," *Macromol. Biosci.*, vol. 7, Nro. 2, pp. 144–151, 2007.
- [59] H.-Q. Wu, W.-B., Gong, Y.J., Zhou, X.-F., Dai, "Preparation and properties of magnetic cellulose fiber composites," *BioResources*, vol. 6, Nro. 3, pp. 3396–3409, 2011.
- [60] G. Mashkour, M., Tajvidi, M., Kimura, T., Kimura, F., Ebrahimi, "Fabricating unidirectional magnetic papers using permanent magnets to align magnetic

- nanoparticle covered natural cellulose fibers," *BioResources*, vol. 6, Nro. 4, pp. 4731–4738, 2011.
- [61] P. Tiberto, P., Barrera, G., Celegato, F., Coisson, M., Chiolerio, A., Martino, P., Pandolfi, P., Allia, "Magnetic properties of jet-printer inks containing dispersed magnetite nanoparticles," *Eur. Phys. J. B*, vol. 86, Nro. 4, pp. 173–178, 2013.
- [62] X. Hofmann-Antenbrink, M., Hofmann, H., Montet, "Superparamagnetic nanoparticles, a tool for early diagnostics," *Swiss Med. Wkly. Off. J. Swiss Soc. Infect. Dis. Swiss Soc. Intern. Med. Swiss Soc. Pneumol.*, vol. 140, pp. 13081–13088, 2010.
- [63] M. Bayrakci, M. Maltaş, E. Yigiter, S. Özmen, "Synthesis and application of novel magnetite nanoparticle based azacrown ether for protein recognition," *Macromol. Res.*, vol. 21, Nro. 9, pp. 1029–1035, 2013.
- [64] M. Maltas, E. Ozmen, M. Vural, H.C. Yildiz, S. Ersoz, "Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 65, Nro. 23–24, pp. 3499–3501, 2011.
- [65] P. Reddy, L.H. Arias, J.L. Nicolas, J. Couvreur, "Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications," *Chem. Rev.*, vol. 112, Nro. 11, pp. 5818–5878, 2012.
- [66] A. Zhao, C. Yu, L. Middelberg, "Magnetic mesoporous silica nanoparticles end-capped with hydroxyapatite for pH-responsive drug release," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, Nro. 37, pp. 4828–4833, 2013.
- [67] A. Wahajuddin, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3445–3471, 2012.
- [68] X. Yang, B. Feng, X. He, F. Li, Y. Ding, J. Fei, "Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines," *Microchim. Acta*, vol. 180, Nro. 11–12, pp. 935–956, 2013.
- [69] N. P. Santhosh, P.B. Ulrih, "Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics," *Cancer Lett.*, vol. 336, Nro. 1, pp. 8–17, 2013.
- [70] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fa, R. Felix, "Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 201, pp. 413–419, 1999.

- [71] A.-H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, application," *Angew. Chemie (International ed.)*, vol. 46, Nro. 8, pp. 1222–1244, 2007.
- [72] L. F. Mamani, J.B., Costa-Filho, A.J., Cornejo, D.R., Vieira, E.D., Gamarra, "Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid," *Mater. Charact.*, vol. 81, pp. 26–36, 2013.
- [73] A. Gunay, M., Kavas, H., Baykal, "Simple polyol route to synthesize heptanoic acid coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles," *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, Nro. 3, pp. 1296–1303, 2013.
- [74] S. Luna-Martínez, J.F. Reyes-Melo, E. González-González, V. Guerrero-Salazar, C. Torres-Castro, A. Sepúlveda-Guzmán, "Synthesis and characterization of a magnetic hybrid material consisting of iron oxide in a carboxymethyl cellulose matrix," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 127, Nro. 3, pp. 2325–2331, 2013.
- [75] H. Günay, M., Baykal, A., Sözeri, "Structural and magnetic properties of triethylene glycol stabilized monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles," *J. Supercond. Nov. Magn.*, vol. 25, Nro. 7, pp. 2415–2420, 2012.
- [76] V. A. Gonzalez, J.S. Hoppe, C.E. Muraca, D. Sánchez, F.H. Alvarez, "Synthesis and characterization of PVA ferrogels obtained through a one-pot freezing-thawing procedure," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 289, Nro. 17–18, pp. 1839–1846, 2011.
- [77] T. Satyabrata, S. Kotal, A. Mandal, T.K. Giri, S. Nakamura, H. Kohara, "Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of polyelectrolytes," *Chem. Mater.*, vol. 16, Nro. 18, pp. 3489–3496, 2004.
- [78] X. Chen, A., Wang, H., Zhao, B., Li, "The preparation of polypyrrole-Fe₃O₄ nanocomposites by the use of common ion effect," *Synth. Met.*, vol. 139, Nro. 2, pp. 411–415, 2003.
- [79] S. Kazeminezhad, I. , Mosivand, "Effect of surfactant concentration on size and morphology of sonoelectrooxidized Fe₃O₄ nanoparticles," *Curr. Nanosci.*, vol. 8, Nro. 4, pp. 623–627, 2012.
- [80] S. Mosivand, L. M. a Monzon, I. Kazeminezhad, J. M. D. Coey, "Influence of growth conditions on magnetite nanoparticles electro-crystallized in the presence of organic molecules," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, Nro. 5, pp. 10383–10396, 2013.
- [81] Z. Li, H. Chen, H. Bao, M. Gao, "One-Pot Reaction to Synthesize Water-Soluble Magnetite Nanocrystals," *Chem. Mater.*, vol. 16, Nro. 8, pp. 1391–1393, 2004.

- [82] T. Lu, T., Wang, J., Yin, J., Wang, A., Wang, X., Zhang, “Surfactant effects on the microstructures of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by microemulsion method,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 675–683, 2013.
- [83] R. Vijayakumar, Y. Koltypin, I. Felner, A. Gedanken, “Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles,” vol. 286, pp. 101–105, 2000.
- [84] F. Dai, J. Wu, S. Li, P. Chen, X. Liu, L. Liu, J., Sun, D. Chen w. Chen, B. Li, “Facile synthesis of pectin coated Fe₃O₄ nanospheres by the sonochemical method,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 331, pp. 62–66, 2013.
- [85] J. M. Mosivand, S. Monzon, L.M.A. Ackland, K. Kazeminezh, I. Coey, “The effect of organics on the structure and magnetization of electro-synthesised magnetite nanoparticles,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, Nro. 7, pp. 1795–1806, 2013.
- [86] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M. P. Morales, P. Herrasti, “Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization,” *Electrochim. Acta*, vol. 53, Nro. 8, pp. 3436–3441, 2008.
- [87] P. T. Kobayashi, “Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles,” *Biotechnol. J.*, vol. 6, Nro. 11, pp. 1342–1347, 2011.
- [88] M. Kazeminezhad, I. , Mosivand, S., Farbod, “Effect of growth parameters on structure of electrooxidized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles,” *Curr. Nanosci.*, vol. 7, Nro. 5, pp. 819–824, 2011.
- [89] O. V. Prezhdo, “Graphene — The ultimate surface material,” *Surf. Sci.*, vol. 605, Nro. 17–18, pp. 1607–1610, 2011.
- [90] K. S. Novoselov, K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, A. A. Firsov, “Electric field effect in atomically thin carbon films,” *Science (80)*, vol. 306, Nro. 5696, pp. 666–669, 2004.
- [91] O. V. Prezhdo, “Graphene — The ultimate surface material,” *Surf. Sci.*, vol. 605, Nro. 17–18, pp. 1607–1610, 2011.
- [92] X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey, H. Zhang, “Graphene-based materials: synthesis, characterization, properties, applications,” *Small*, vol. 7, Nro. 14, pp. 1876–1902, 2011.
- [93] X. S. Xu, C., Xu, B., Gu, Y., Xiong, Z., Sun, J., Zhao, “Graphene-based electrodes for electrochemical energy storage,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, Nro. 6, pp. 1388–1414, 2013.

- [94] J. Kucinskis, G. Bajars, G. Kleperis, "Graphene in lithium ion battery cathode materials: A review," *J. Power Sources*, vol. 240, pp. 66–79, 2013.
- [95] M. Kim, Y.A. Hayashi, T. Kim, J.H. Endo, "Important roles of graphene edges in carbon-based energy storage devices," *J. Energy Chem.*, vol. 22, Nro. 2, pp. 183–194, 2013.
- [96] T. Chen, L. Dai, "Carbon nanomaterials for high-performance supercapacitors," *Mater. Today*, vol. 16, Nro. 7–8, pp. 272–280, 2013.
- [97] X. Weiss, N.O., Zhou, H., Liao, L., Liu, Y.b, Jiang, S., Huang, Y., Duan, "Graphene: An emerging electronic material," *Adv. Mater.*, vol. 24, Nro. 43, pp. 5782–5825, 2012.
- [98] S. M. Sham, A.Y. Notley, "A review of fundamental properties and applications of polymer-graphene hybrid materials," *Soft Matter*, vol. 9, Nro. 27, pp. 6645–6653, 2013.
- [99] G. Xu, J. Zheng, J. Tian, J. Zhu, F. Zeng, F. Su, C. Ouyang, "New materials in solid-phase microextraction," *Trends Anal. Chem.*, vol. 47, pp. 68–83, 2013.
- [100] R. Lv, M Terrones, "Towards new graphene materials: Doped graphene sheets and nanoribbons," *Mater. Lett.*, vol. 78, pp. 209–218, 2012.
- [101] G. . Minter, S.D., Atanassov, P., Luckarift, H.R., Johnson, "New materials for biological fuel cells," *Mater. Today*, vol. 15, Nro. 4, pp. 166–173, 2012.
- [102] D. Kato, O. Niwa, "Carbon-based electrode materials for DNA electroanalysis," *Anal. Sci.*, vol. 29, Nro. 4, pp. 385–392, 2013.
- [103] Y. Song, M. Feng, H. Zhan, "Application of graphene edge effect in electrochemical biosensors," *Prog. Chem.*, vol. 25, Nro. 5, pp. 698–706, 2013.
- [104] Y. Song, M. Feng, H. Zhan, "Applications of graphene nanocomposites in electrochemical biosensors," *Prog. Chem.*, vol. 24, Nro. 5, pp. 1665–1673, 2012.
- [105] W. T. Kochmann, Hirsch S., "Graphenes in chemical sensors and biosensors," *Trends Anal. Chem.*, vol. 39, pp. 87–113, 2012.
- [106] W. Dharuman, V. Hahn, J.H. Jayakumar, K. Teng, "Electrochemically reduced graphene-gold nano particle composite on indium tin oxide for label free immuno sensing of estradiol," *Electrochim. Acta*, vol. 114, pp. 590–597, 2013.
- [107] C. R. Dey, R.S. Raj, "A hybrid functional nanoscaffold based on reduced graphene oxide-ZnO for the development of an amperometric biosensing platform," *RSC Adv.*, vol. 3, Nro. 48, pp. 25858–25864, 2013.

- [108] A. Karuwan, C. Wisitsoraat, A. Phokharatkul, D. Sriprachuabwong, C. Lomas, T. Nacapricha, D. Tuantranont, "A disposable screen printed graphene-carbon paste electrode and its application in electrochemical sensing," *RSC Adv.*, vol. 3, Nro. 48, pp. 25792–25799, 2013.
- [109] M. Pumera, "Graphene in biosensing," *Mater. Today*, vol. 14, Nro. 7–8, pp. 308–315, 2011.
- [110] M. Pumera, "Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, Nro. 11, pp. 4146–4157, 2010.
- [111] M. Pumera, "Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage," *Chem. Rec.*, vol. 9, Nro. 4, pp. 211–223, 2009.
- [112] G. Politano, A. Chiarello, "On the intercalation of CO molecules in ultra-high vacuum conditions underneath graphene epitaxially grown on metal substrates," *Carbon N. Y.*, vol. 62, pp. 263–269, 2013.
- [113] Y. Entani, S. Kurahashi, M. Sun, X. Yamauchi, "Spin polarization of single-layer graphene epitaxially grown on Ni(1 1 1) thin film," *Carbon N. Y.*, vol. 61, pp. 134–139, 2013.
- [114] Y. Dedkov, K. Horn, A. Preobrajenski, M. Fonin, "Epitaxial graphene on metals," *Nanosci. Technol.*, vol. 57, pp. 189–234, 2012.
- [115] C. Jeon, H.-N. Hwang, W.-G. Lee, Y. G. Jung, K. S. Kim, C.-Y. Park, C.-C. Hwang, "Rotated domains in chemical vapor deposition-grown monolayer graphene on Cu(111): An angle-resolved photoemission study," *Nanoescape*, vol. 5, Nro. 17, pp. 8210–8214, 2013.
- [116] C.-W. Lee, J.-H. Song, K.-W. Park, M.-H. Kim, H.-K. Yang, "Graphene growth at the interface between Ni catalyst layer and SiO₂/Si substrate," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 11, Nro. 7, pp. 6468–6471, 2011.
- [117] H. Kim, E. Kim, W.-J. Lee, J. Jung, "Effects of hydrogen in the cooling step of chemical vapor deposition of graphene," *Electron. Mater. Lett.*, vol. 9, Nro. 4, pp. 417–420, 2013.
- [118] P. K. Ang, S. Wang, Q. Bao, J. T. L. Thong, K. P. Loh, "High-throughput synthesis of graphene by intercalation-exfoliation of graphite oxide and study of ionic screening in graphene transistor," *ACS Nano*, vol. 3, Nro. 11, pp. 3587–3594, 2009.
- [119] Y. . Cano-Márquez, A.G., Rodríguez-Macías, F.J., Campos-Delgado, J., Espinosa-González, C.G., Tristán-López, F., Ramírez-González, D., Cullen, D.A., Smith, D.J., Terrones, M., Vega-Cantú, "Ex-MWNTs: Graphene Sheets and Ribbons Produced

- by Lithium Intercalation and Exfoliation of Carbon Nanotubes,” *Nano Lett.*, vol. 9, Nro. 4, pp. 1527–1533, 2009.
- [120] C. Tu, F., Liu, S., Jin, G., Yan, G., Pan, “Fabrication of graphene from graphene oxide by ultrasonication with high Li storage capability,” *Powder Technol.*, vol. 249, pp. 146–150, 2013.
- [121] J. R. Kosynkin, D. V. Higginbotham, A. L. Sinitiskii, A. Lomeda, J. M. Dimiev, A. Price, K. Tour, “Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons,” *Nature*, vol. 458, Nro. 7240, pp. 872–876, 2009.
- [122] B. C. Brodie, “On the Atomic Weight of Graphite,” *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 149, Nro. January, pp. 249–259, 1859.
- [123] R. Willams Hummers, “Preparation of Graphitic Oxide,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, p. 1339, 1958.
- [124] S. Zhou, M., Wang, Y., Zhai, Y., Zhai, J., Ren, W., Wang, F., Dong, “Controlled synthesis of large-area and patterned electrochemically reduced graphene oxide films,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 15, Nro. 25, pp. 6116–6120, 2009.
- [125] W. Gao, L. B. Alemany, L. Ci, P. M. Ajayan, “New insights into the structure and reduction of graphite oxide,” *Nat. Chem.*, vol. 1, Nro. 5, pp. 403–408, 2009.
- [126] F. Gao, X. Cai, X. Wang, C. Gao, S. Liu, F. Gao, Q. Wang, “Highly sensitive and selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at graphene oxide modified electrode,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, pp. 380–387, 2013.
- [127] R. S. Martin Pumera, M. B. Pro, “A Mechanism of Adsorption of β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide on Graphene Sheets: Experiment and Theory,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 15, Nro. 41, pp. 10851–10856, 2009.

“Si Dios existe espero tenga una buena excusa”.

Woody Allen.

Capítulo II

Materiales y métodos

Materiales y métodos

El análisis y la caracterización de los sistemas estudiados en este trabajo de tesis fueron abordados a través de diferentes técnicas electroquímicas, microscópicas, espectroscópicas y difracción de rayos X. En este capítulo se presentan sus fundamentos y aplicaciones. Asimismo, se describen las principales características de los materiales y electrodos utilizados y se detallan las metodologías de síntesis empleadas en la preparación de los nanomateriales que se usaron en la construcción de los (bio)sensores desarrollados.

1. Técnicas empleadas

1.1. Electroquímicas

Las técnicas electroquímicas estudian las reacciones químicas que tienen lugar en la interfaz entre un conductor electrónico (metal o semiconductor) y un conductor iónico (electrolito), e implican la transferencia de electrones entre el electrodo y el electrolito o especies en solución. La caracterización electroquímica de un determinado sistema o sustancia, como así también la determinación de la concentración de esta última, pueden ser llevadas a cabo a través de la medición de la corriente, el potencial, la resistencia, la conductividad, la carga, entre otras variables. La utilización de las técnicas electroquímicas con propósitos analíticos (electroanalítica) posee un vasto rango de aplicaciones que van desde el control ambiental y de la calidad industrial hasta los análisis biomédicos [1].

Las técnicas electroquímicas que se discutirán en este capítulo son divididas en:

- Técnicas de barrido de potencial: voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial.
- Técnicas de pulso de potencial: cronoamperometría, amperometría y voltamperometría hidrodinámica.

1.1.1. Técnicas de barrido de potencial

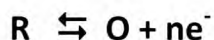
Entre todos los métodos electroquímicos utilizados para estudiar los procesos superficiales electródicos, los métodos de barrido de potencial son los más explotados, ya que permiten obtener una primera aproximación sobre el comportamiento electroquímico de un sistema. Se basan en la aplicación de una perturbación al electrodo de trabajo que consiste en la variación del potencial con el tiempo y el subsiguiente registro de la corriente.

Existen diversas formas de aplicar dicha perturbación en función del tiempo, dando lugar a una variedad de técnicas voltamperométricas. A continuación se explicará el fundamento de las técnicas voltamperométricas utilizadas en este trabajo de tesis.

1.1.1.1. Voltamperometría cíclica

Esta técnica suele utilizarse en forma previa a cualquier estudio electroquímico ya que provee una información global acerca del sistema en estudio [2]. Consiste en la aplicación de un barrido triangular de potencial a una cierta velocidad desde un valor inicial de potencial (E_1) hasta un potencial llamado de corte (E_2) en el que se invierte el sentido del barrido hasta un potencial final (E_3) que puede ser el mismo que el inicial u otro. La corriente obtenida es registrada en función del potencial aplicado obteniéndose un voltamperograma cíclico [2].

En la **Figura 1** se esquematiza el barrido triangular de potencial, el voltamperograma correspondiente y el perfil de concentración de la especie reducida R en función de la distancia a la superficie del electrodo para la reacción:



Para un sistema que contiene solamente R si el barrido comienza a E_1 y éste es bastante menor que el potencial estándar de la cupla redox E^0 , el proceso faradaico no se produce y la corriente que se registra es sólo capacitiva (a en la **Figura 1B y C**).

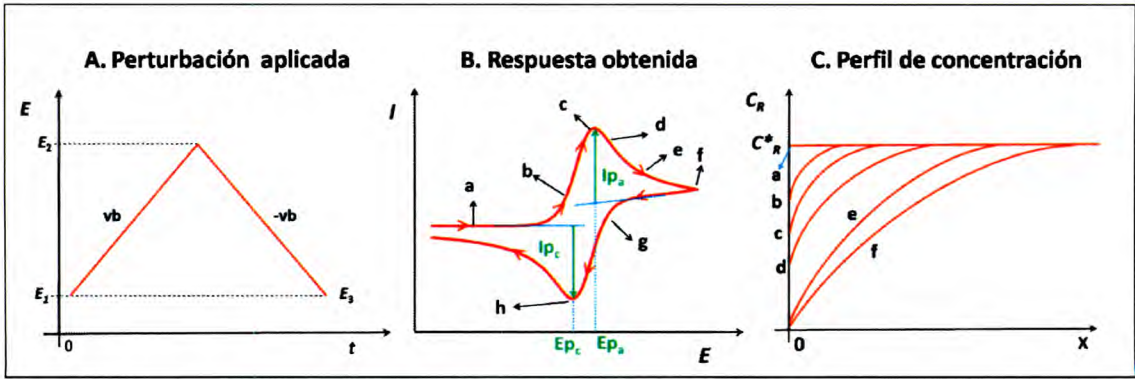


Figura 1. (A) Esquematación de la perturbación triangular de potencial utilizado en voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido vb . (B) Respuesta resultante en corriente. (C) Perfil de la concentración de R en función de la distancia al electrodo.

A medida que el potencial aplicado se aproxima a E^0 , la reacción electroquímica comienza a tener lugar sobre el electrodo, dando como resultado una corriente de oxidación. De esta forma, la concentración de R sobre el electrodo comienza a disminuir según la ecuación de Nernst (b en la Figura 1B y C):

$$E = E^0 + \frac{2,303RT}{nF} + \log \left[\frac{C_0(0,t)}{C_R(0,t)} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde $E(t)$ es el potencial del electrodo como función del tiempo, E^0 es el potencial formal de la cupla redox, R es la constante de los gases, T es la temperatura, n es el número de electrones involucrados en la reacción, F es la constante de Faraday, $C_0(0,t)$ es la concentración de la especie oxidada sobre la superficie del electrodo al tiempo t y $C_R(0,t)$ la de la especie reducida [3].

La corriente obtenida es proporcional al gradiente de concentración que se produce en la interfase electrodo/solución debido al consumo de R. Cuando se alcanza un sobrepotencial tal que el gradiente de concentración es máximo, la oxidación transcurre a su máxima velocidad y la corriente es máxima (c en la Figura 1B y C). Es importante mencionar que el consumo de R sobre la superficie del electrodo lleva a un incremento de la capa difusional y a la consecuente caída de la pendiente en los perfiles de concentración una vez que se ha consumido toda la especie

electroactiva, provocando una caída de la corriente en el voltamperograma luego de alcanzar el máximo de corriente (tramo **d-f** en la **Figura 1 B**).

Al invertir la dirección del barrido, al principio la corriente sigue siendo anódica, debido a que el sobrepotencial no es capaz de originar la reducción de O acumulada en la interfase durante el barrido directo. En el momento que el sobrepotencial es suficiente como para que tenga lugar la reducción de O se genera una corriente catódica, alcanzando un máximo una vez que la reducción transcurre a su máximo valor (**g** y **h** respectivamente en la **Figura 1 B** y **C**) [3].

La respuesta voltamperométrica depende del tipo de proceso que tiene lugar sobre el electrodo de trabajo. Los límites del potencial definen las reacciones electrónicas que pueden ocurrir y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se examina el proceso electroquímico. El análisis de la respuesta voltamperométrica también permite observar si existen procesos acoplados a los de oxidación y/o reducción, por ejemplo procesos de adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga electrónica [2].

La voltamperometría cíclica es una técnica que provee las herramientas para conocer la respuesta electroquímica de una cupla rédox sobre una superficie electródica a partir de los parámetros de diagnóstico que se obtienen, según los criterios desarrollados por Nicholson en 1964 [4]. Los parámetros voltamperométricos de interés son el valor de las corrientes tanto de pico de oxidación (I_{pa}) como reducción (I_{pc}), su relación (I_{pa}/I_{pc}), los potenciales de pico de oxidación (E_{pa}) y de reducción (E_{pc}) así como su diferencia ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$). Estos parámetros permiten caracterizar el proceso de óxido-reducción que ocurre sobre el electrodo como reversible, cuasirreversible e irreversible.

- **Sistemas reversibles**

Si la transferencia electrónica es tan rápida que el potencial del electrodo de trabajo cumple la ecuación de Nernst, se trata de un proceso reversible. En estos

procesos la velocidad de transferencia electrónica es significativamente mayor que la velocidad de transporte de masa.

La ecuación de Randles–Sevcik establece una proporcionalidad entre I_{pa} obtenido en el barrido directo y la concentración de R en el seno de la solución (C^*_R) a 25 °C según:

$$I_{pa} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C_R^* D_R^{1/2} v_b^{1/2} \quad \text{Ecuación II}$$

donde I_{pa} es la corriente de pico anódico expresada en amperes, n es el número de electrones, A es el área expresada en cm^2 , C^*_R en mol/cm^3 , D_R es el coeficiente de difusión de la especie reducida en cm^2/s , y v_b la velocidad de barrido en V/s [2].

Un criterio rápido para identificar la reversibilidad de un sistema consiste en realizar el cociente de las señales de corriente de pico anódica y catódica para diversas concentraciones o distintas velocidades de barrido. Debe cumplirse que $I_{pa}/I_{pc} = 1$, valores distintos a la unidad indican desviaciones cinéticas en el proceso electroquímico, reacciones químicas acopladas al proceso redox o bloqueo superficial del electrodo entre otros [2].

Para un sistema reversible, el valor de E_{pa} es independiente de v_b , y ΔE_p es igual a 0,059 V por cada mol de electrones transferidos a 25 °C. El valor medio entre E_{pa} y E_{pc} es el E^0 para un proceso reversible [2, 3].

- **Sistemas irreversibles y cuasirreversibles**

Los sistemas irreversibles dependen de la velocidad de barrido de potencial ya que la situación es muy diferente a los reversibles desde el punto de vista cinético del proceso. En este caso el proceso redox es lento respecto al transporte de masa o se encuentra acoplado a una reacción química y el equilibrio de Nernst (**Ecuación I**) no se mantiene en la superficie del electrodo.

Para un sistema totalmente irreversible, en el barrido de potencial inverso no aparece el pico de corriente proveniente de la reducción de la especie oxidada O generada en el barrido directo, por lo que I_{pa}/I_{pc} es muy distinto a la unidad. En trazo

verde en la **Figura 2** se muestra como ejemplo una típica respuesta voltamperométrica de un sistema irreversible.

La separación entre los picos (ΔE_p) es mucho mayor que 0,059 V por mol de electrones transferidos y E_p es dependiente de v_b según la ecuación siguiente:

$$E_{pa} = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D_R^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n F v_b}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{Ecuación III}$$

donde α es el coeficiente de transferencia y k^0 es la constante estándar de velocidad de la reacción electroquímica. De esta forma, E_{pa} es función de k^0 y α . Independientemente del valor de k^0 el desplazamiento del pico puede ser compensado por un cambio apropiado de la velocidad de barrido. Nicholson demostró que para una velocidad de barrido determinada, ΔE_p aumenta a medida que k^0 disminuye [4]. Para un sistema con una determinada constante de velocidad, la separación entre los potenciales de picos aumenta conforme incrementa la velocidad de barrido de potencial [2, 3].

La corriente de pico está dada por:

$$I_{pa} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_R^* D_R^{1/2} v_b^{1/2} \quad \text{Ecuación IV}$$

Los sistemas que presentan un comportamiento intermedio se denominan cuasirreversibles. En estos sistemas la corriente está controlada por la velocidad de transferencia de carga y el transporte de masa, por lo que a v_b bajas se comporta como reversible y a v_b altas como totalmente irreversible. En ellos aparece un pico de corriente en el barrido inverso pero la relación de corriente de pico es distinta a 1. La separación entre los potenciales de pico es mayor que 0,059 V por mol de electrones intercambiados e incrementa con v_b [3, 4]. En trazo azul en la **Figura 2** se muestra como ejemplo una típica respuesta voltamperométrica cuasirreversible.

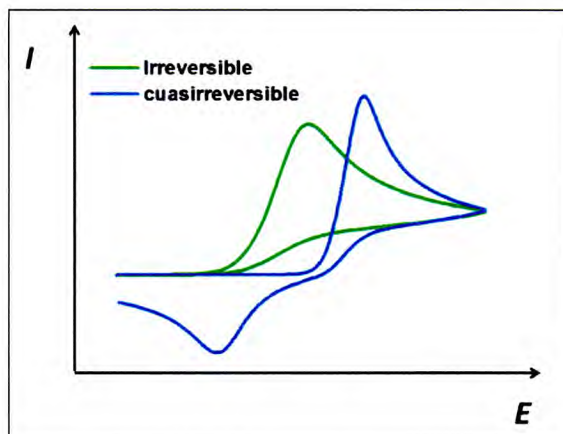


Figura 2. Voltamperogramas cíclicos para un proceso electródico irreversible y cuasi irreversible.

1.1.1.2. Voltamperometría de pulso diferencial

La voltamperometría de pulso diferencial (DPV por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada para realizar mediciones de especies orgánicas e inorgánicas. Consiste en la aplicación de pulsos de magnitud fija superpuestos en una rampa de potencial [2, 5]. En la **Figura 3** se ilustra el programa de potencial aplicado en DPV y el perfil correspondiente de corriente en función del potencial.

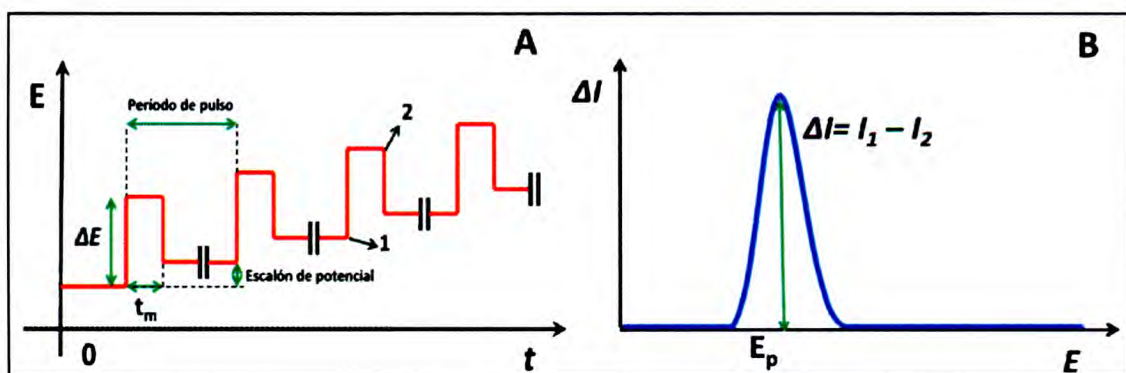


Figura 3. (A) Programa de perturbación aplicado en voltamperometría de pulso diferencial y (B) perfil ΔI -E obtenido con sustracción de la línea de base.

En DPV la corriente se mide dos veces, antes de la aplicación del pulso (punto 1 de la **Figura 3A**) y antes de que termine el pulso (2 de la **Figura 3A**). La primera corriente es sustraída instrumentalmente de la segunda y esta diferencia ($\Delta I = I_1 - I_2$) es graficada en función del potencial aplicado [2].

A partir del voltamperograma de pulso diferencial resultante se obtiene una corriente de pico con una altura proporcional a la concentración del analito electroactivo según la siguiente ecuación:

$$I_p = \frac{nFACD^{1/2}}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right)$$

Ecuación V

donde t_m es el ancho de pulso o el tiempo transcurrido entre el muestreo de la primer y segunda corriente, $\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)]$ y ΔE es la amplitud del pulso. El máximo valor del cociente $(1-\sigma)/(1+\sigma)$ es la unidad y se obtiene a partir de grandes amplitudes de pulso, por lo que describe el efecto de ΔE en la I_p . El E_p puede ser utilizado para la identificación de especies ya que $E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$ [5, 6].

En comparación con la voltamperometría cíclica las medidas por DPV aportan una mejora en la resolución de los picos de corriente debido a las bajas corrientes de fondo y a la forma del pico en la respuesta. De esta forma, es posible distinguir entre dos especies electroactivas con potenciales rédox que se diferencien sólo en 0,050 V, permitiendo realizar ensayos de especiación y análisis de mezclas [2]. El ancho del pico registrado a la mitad de su altura, $W_{1/2}$, es el que se obtiene cuando $I = I_p/2$, el cual mantiene una relación directa con el número de electrones según la **Ecuación VI**.

$$W_{1/2} = \frac{3,52RT}{nF}$$

Ecuación VI

Así, el valor de $W_{1/2}$ a 25 °C corresponde a 0,030 V por mol de electrones transferidos.

Esta técnica permite también una mejora en la sensibilidad ya que es posible lograr límites de detección considerablemente menores a los que permitirían otras técnicas como la voltamperometría cíclica.

La selección instrumental de los parámetros como ΔE , t_m , el escalón de potencial, el período de pulso y la v_b requiere de un compromiso entre la sensibilidad, la

resolución y la practicidad. Por ejemplo aplicar grandes ΔE resulta en corrientes mayores pero a la vez en picos más anchos perdiendo, de esta forma, poder resolutivo [2].

1.1.2. Técnicas de pulso de potencial

Las técnicas de pulso de potencial se basan en la medición de la respuesta en la corriente debido a la aplicación de un potencial. El análisis de dicha respuesta permite conocer la concentración de los analitos como así también obtener información sobre las reacciones involucradas [3, 6].

1.1.2.1. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica que se basa en la aplicación de un escalón de potencial a un electrodo de trabajo inmerso en una solución conteniendo la especie electroactiva y en ausencia de convección forzada, como se muestra en la **Figura 4A**. Considerando la reacción: $R \rightleftharpoons O + ne^-$, al aplicar un potencial tal que la reacción electroquímica transcurra a su máxima velocidad, la especie R se agotará en la superficie del electrodo. Esto genera un gradiente de concentración que produce un flujo de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo (**Figura 4B**). Dado que en estas condiciones, el transporte de masa es controlado solamente por difusión, el gradiente de concentración (**Figura 4B**) y por lo tanto la corriente (**Figura 4C**) disminuyen con el tiempo debido a una expansión gradual de la capa difusional asociada al consumo de la especie electroactiva R.

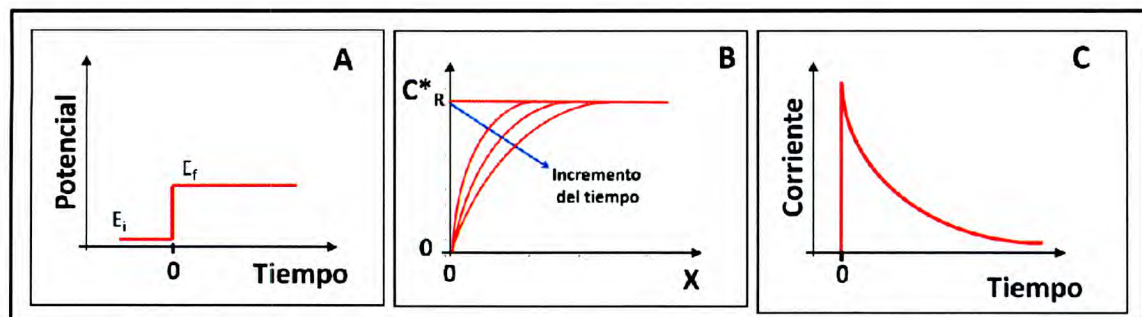


Figura 4. (A) Perturbación de potencial aplicado en cronoamperometría. (B) Cambio de los perfiles de concentración para la especie electroactiva R en función de la distancia al electrodo y según la variación del tiempo. C^*_R corresponde a la concentración de la especie reducida en el seno de la solución. (C) Respuesta corriente vs. tiempo correspondiente.

El decaimiento de la corriente en el tiempo para un electrodo plano está dado por la ecuación de Cottrell [2]:

$$i(t) = \frac{nFA C_R^* D^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

Ecuación VII

donde $i(t)$ es la corriente, A el área del electrodo, C_R^* la concentración de la especie electroactiva (R en este caso) en el seno de la solución y D su coeficiente de difusión.

Esta ecuación posee dos importantes limitaciones: a tiempos de medición mayores que 30 s la convección natural puede dar lugar a desviaciones de la linealidad. Por otro lado, a tiempos de medición menores que 50 ms, la corriente no faradaica proveniente del cargado de la doble capa que se genera como producto de la aplicación del escalón de potencial también puede producir desviaciones [2].

1.1.2.2. Amperometría

En esta técnica se emplea un electrodo de trabajo inmerso en una solución bajo convección forzada, mediante la utilización de un agitador magnético, generando un aporte hidrodinámico de materia a la superficie del electrodo. Con el objeto de una mejor comprensión, en la **Figura 5** se muestran los tres modelos de flujo de un líquido en una solución vigorosamente agitada.

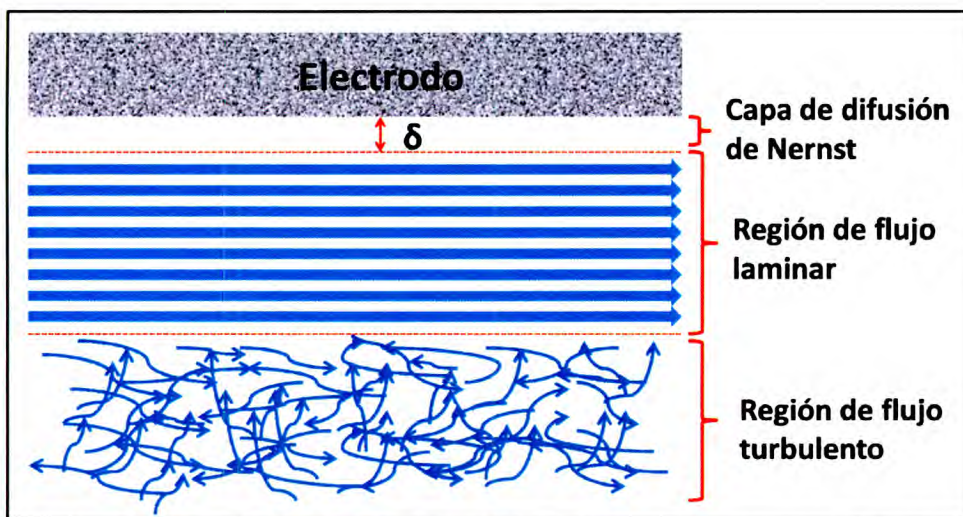


Figura 5. Modelos de flujo de un líquido en una solución bajo convección forzada.

El flujo turbulento se da en el seno de la solución, lejos de la superficie del electrodo y el movimiento del líquido no tiene un modelo regular. Para el caso del flujo laminar, este ocurre en las cercanías de la superficie electródica, y las capas de líquido se deslizan de un lado al otro en una dirección paralela a la superficie del electrodo. En las zonas de flujo turbulento y laminar, el transporte de masa tiene lugar por convección mecánica proveniente del agitador [3].

La solución agitada genera, además, una capa difusional sobre el electrodo cuyo espesor dependerá de la velocidad de agitación y de la viscosidad del medio. Es así que a una distancia δ de la superficie del electrodo la velocidad de flujo laminar se aproxima a cero como resultado de la fricción entre el líquido y el electrodo, dando lugar a una capa delgada de solución estacionaria llamada capa de difusión de Nernst. En esta capa difusional el transporte es únicamente controlado por difusión, igual que en el caso de un sistema que se encuentra estático o sin agitación, sólo que en este caso no aumenta con el tiempo. De esta forma, luego de aplicar un salto de potencial, se obtienen corrientes estacionarias [3].

Experimentalmente se procede del siguiente modo: se aplica un escalón de potencial sobre el electrodo de trabajo inmerso en una solución agitada y sin la especie electroactiva, y se espera hasta obtener una corriente estacionaria. Este salto de potencial debe permitir que la reacción electroquímica de interés transcurra sobre el electrodo. Al alcanzarse dicho estado estacionario se obtiene una línea de base estable, a partir de la cual se realiza un agregado de analito a la celda de reacción y se mide la corriente estacionaria obtenida con el tiempo (**Figura 6A**) [3].

La convección es la que mantiene un suministro constante de la especie en el límite externo de la capa difusional. De este modo se obtiene una corriente estacionaria (I_{ss}) determinada por el potencial aplicado y para cada concentración de analito presente en la celda según la **Ecuación VIII**.

$$I_{SS} = \frac{nFADC^*}{\delta}$$

Ecuación VIII

Como puede observarse en la **Figura 6B**, la variación de I_{ss} se grafica en función de la concentración obteniéndose una curva de calibración.

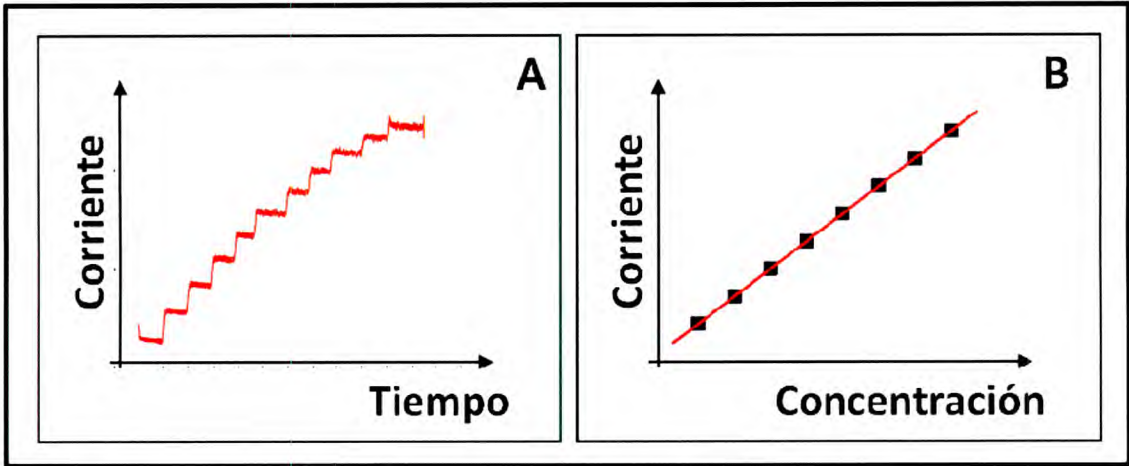


Figura 6. (A) Registro amperométrico para agregados sucesivos del analito. (B) Curva de calibración correspondiente.

1.1.2.3. Voltamperometría hidrodinámica

En esta técnica también se utiliza la convección forzada y se la puede considerar una extensión de la amperometría, ya que consiste en la realización de determinaciones amperométricas a distintos potenciales. Como puede observarse en la **Figura 7**, se grafica la corriente estacionaria alcanzada en función del potencial aplicado.

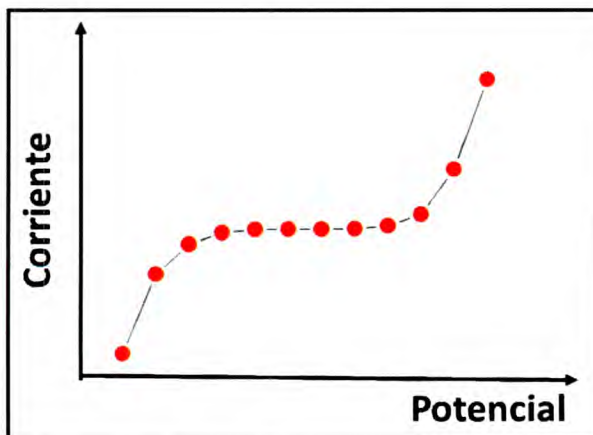


Figura 7. Voltamperograma hidrodinámico obtenido a partir del agregado de analito bajo convección forzada.

Además de permitir obtener información importante acerca del comportamiento electroquímico del analito en cuestión, esta técnica permite seleccionar el potencial de trabajo adecuado para posteriores determinaciones amperométricas.

1.1.3. Técnicas de preconcentración

La técnicas de preconcentración o "*stripping*" han sido utilizadas para la determinación de cationes, aniones y especies neutras permitiendo la detección de muy bajos niveles de concentración [7–9]. Se trata de técnicas muy útiles para la determinación de especies químicas que se encuentran a nivel de trazas como así también para estudios de especiación [5]. Es posible lograr un aumento de sensibilidad y una mejora sustancial en el límite de detección a partir de una etapa previa de preconcentración del analito. Esta acumulación puede llevarse a cabo por control del potencial o la corriente aplicada o simplemente a potencial de circuito abierto [5].

Es importante mencionar que existen diversas alternativas en cuanto a las técnicas de preconcentración y subsiguiente determinación electroquímica. El proceso consta básicamente de tres etapas:

- a) Preconcentración: deposición o adsorción de la/s especie/s sobre el electrodo durante un tiempo determinado (etapa de pre-concentración). Se debe utilizar la convección forzada para asegurar la llegada constante de masa a la superficie del electrodo.
- b) Cambio de medio: enjuague de la superficie electródica con un medio electrolítico adecuado y pasaje a la celda de detección con el electrolito soporte.
- c) Detección: reducción u oxidación de la/s especie/s acumulada sobre el electrodo empleando una técnica electroquímica apropiada.

Se han desarrollado importantes aplicaciones a partir del "*stripping*" voltamperométrico anódico para la determinación de cantidades traza de metales

como Cd, Cu, Pb y Zn [10]. En este trabajo de tesis doctoral se utilizó “stripping” voltamperométrico adsorbtivo (AdSV) sobre electrodos de pasta de carbono para la determinación de dopamina.

En la **Figura 8** se esquematizan los pasos involucrados en la determinación de dopamina por AdSV. La preconcentración superficial de este analito se realizó por adsorción a potencial de circuito abierto durante un determinado tiempo bajo convección forzada. A continuación, el electrodo de trabajo fue enjuagado y transferido a una solución “buffer” libre del analito, donde se efectuó la oxidación de la especie acumulada superficialmente registrando la señal de dicho proceso empleando DPV. Esta etapa permite mejorar la selectividad en la determinación del analito.

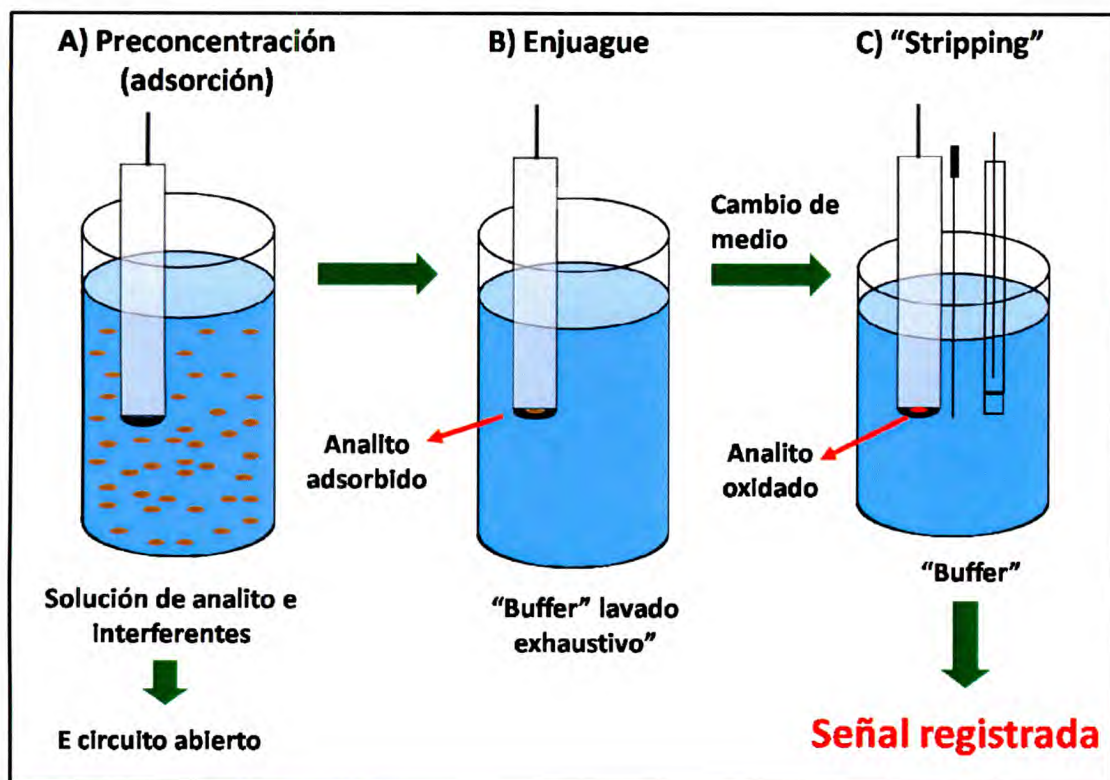


Figura 8. Representación esquemática de los pasos involucrados en la determinación de dopamina por AdSV. (A) Adsorción del analito a potencial de circuito abierto. (B) Enjuague en “buffer” fosfato y cambio de medio. (C) Oxidación de la dopamina adsorbida sobre la superficie del electrodo mediante “stripping” voltamperométrico y subsiguiente registro de la señal.

1.1.4. Espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) es una técnica poderosa y no destructiva que permite caracterizar las propiedades eléctricas de materiales e interfaces. Las medidas de impedancia implican la aplicación de perturbaciones (potencial o corriente) periódicas de pequeña amplitud y el análisis de la respuesta del sistema [11].

Si se aplica a la interfaz electródica una señal sinusoidal de potencial dependiente del tiempo, de amplitud (E_m) y frecuencia angular ω , dicha perturbación se expresa como:

$$E(t) = E_m \text{sen}(\omega t) \tag{Ecuación IX}$$

donde $\omega = f/2\pi$ (f es la frecuencia en radianes s^{-1}), la respuesta de corriente que se obtiene es también periódica, difiriendo en amplitud y en fase respecto a la perturbación impuesta al sistema según:

$$I(t) = I_m \text{sen}(\omega t + \varphi) \tag{Ecuación X}$$

siendo I_m la amplitud de la corriente y φ el ángulo de fase, que da cuenta de la diferencia de fase entre ambas señales periódicas como se muestra en la **Figura 9**.

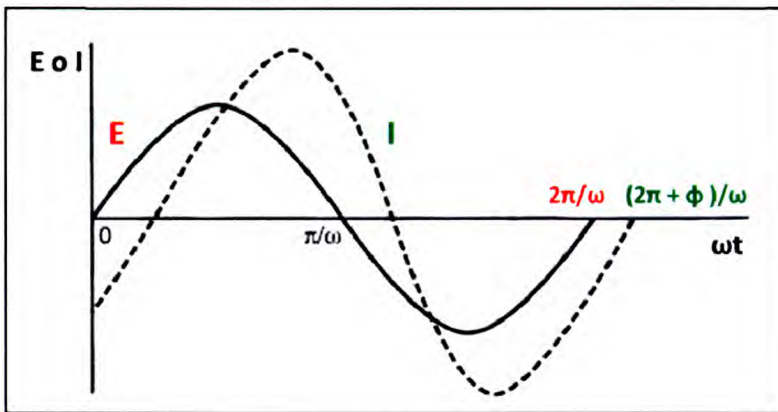


Figura 9. Señales periódicas de potencial y corriente.

El cociente entre las dos señales periódicas se denomina impedancia:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)}$$

Ecuación XI

y su módulo es:

$$|Z(\omega)| = \frac{E_m}{I_m}(\omega)$$

Ecuación XII

La impedancia también se puede expresar como un número complejo:

$$Z(\omega) = Z' + jZ''$$

Ecuación XIII

donde $j = \sqrt{-1}$; Z' es la parte real y Z'' la parte imaginaria de la impedancia. La componente real está asociada con el comportamiento resistivo y la imaginaria con el capacitivo. Como todo número complejo, la impedancia Z puede representarse en coordenadas rectangulares o en coordenadas polares. En coordenadas polares los datos se representan como $\log |Z|$ vs. $\log(\omega)$ y ϕ vs. $\log(\omega)$, conocidos como gráfico de Bode (**Figura 10 A**) [11]. Por otro lado, la representación en el plano complejo (Z'' vs Z') se conoce como diagrama de Nyquist (**Figura 10 B**).

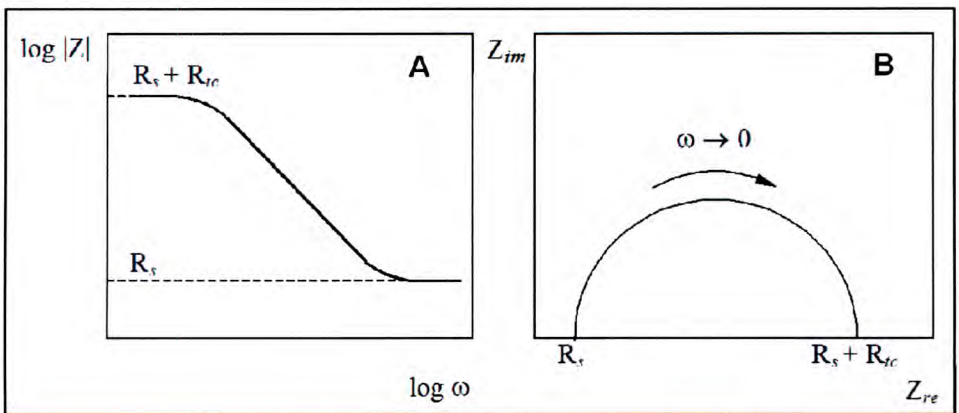


Figura 10. (A) Gráfico de Bode. (B) Diagrama de Nyquist.

La impedancia constituye una magnitud muy importante para un sistema electroquímico ya que al medirse en un amplio rango de frecuencias (idealmente

infinito) es posible obtener mucha información del sistema [11]. Los datos de impedancia obtenidos experimentalmente para un determinado sistema son analizados usando un modelo matemático exacto basado en una teoría física plausible, o empíricamente por medio de un circuito eléctrico equivalente. En ambos casos, los parámetros del modelo pueden ser estimados y los datos experimentales comparados con la impedancia teórica. En este trabajo de tesis, dicho modelo fue representado en término de análogos eléctricos como resistencias y capacitores, mediante un circuito equivalente formado por un número discreto de componentes. La interpretación física de estos elementos puramente eléctricos y su distribución está asociada directamente con la disposición espacial de un sistema real. Estos elementos pueden estar también relacionados con otros procesos, como es el caso de la difusión [12].

1.1.4.1. Circuitos eléctricos equivalentes

En un circuito equivalente, una resistencia puede representar un camino de conducción, la conductividad del seno de un material o estar asociada con una etapa química correspondiente a una reacción de transferencia de carga. La respuesta en corriente de una resistencia, R , frente a una señal periódica de potencial, es una impedancia que solo tiene componente real y cuyo módulo es R :

$$Z = Z' = R \quad \text{Ecuación XIV}$$

De manera similar, las capacitancias y/o inductancias están generalmente asociadas con regiones de polarización de carga, adsorción de especies, procesos de electrocristalización, entre otros. Para un capacitor, la impedancia es función de la frecuencia:

$$Z = -j \frac{1}{\omega C} \quad \text{Ecuación XV}$$

cuyo módulo está dado por:

$$\log |Z| = -\log C - \log \omega \quad \text{Ecuación XVI}$$

Los ángulos de fase que corresponden a una resistencia y a un capacitor puros son 0° y 90° respectivamente. Combinando estos elementos eléctricos simples es posible representar razonablemente los procesos que ocurren en una celda electroquímica. Así por ejemplo, una reacción de transferencia de carga a través de la doble capa eléctrica de un electrodo en contacto con un electrolito, puede ser representada mediante el circuito equivalente denominado $(R_s(R_{tc}C_{dc}))$ tal como se muestra en la **Figura 11**, donde C_{dc} representa la capacidad de la doble capa, R_s la resistencia de la solución y R_{tc} la resistencia a la transferencia de carga en la interfase. La impedancia para dicho circuito resulta:

$$Z = \frac{R_{tc}}{1 + j\omega CR_{tc}} + R_s \quad \text{Ecuación XVII}$$

El correspondiente gráfico de Bode mostrado en la **Figura 10A** muestra que $\log |Z|$ es constante en los valores extremos de frecuencia, siendo $|Z|$ igual a la suma de las resistencias ($R_s + R_{tc}$) en el límite de frecuencias bajas e igual a R_s en el límite de frecuencias altas. En el intervalo de frecuencias intermedias el comportamiento es capacitivo y $\log |Z|$ varía de forma lineal con $\log |\omega|$ con una pendiente de -1. En el diagrama de Nyquist mostrado en la **Figura 10B** se observa un semicírculo en el que Z es real e igual a la suma de las resistencias en el límite de frecuencias muy bajas e igual a la resistencia de la solución en el límite de las frecuencias muy elevadas. En el máximo del semicírculo, $\omega = 1/ R_{tc} C$, de modo que el valor de C puede calcularse a partir de la frecuencia en ese punto [11].

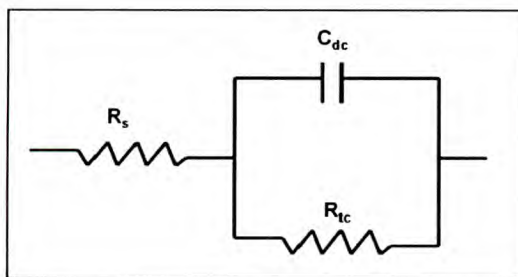


Figura 11. Circuito equivalente $R_s(R_{tc}C_{dc})$ para una reacción de transferencia de carga en una interfaz electrodo/solución.

En sistemas más complejos, cuando además de la resistencia a la transferencia de carga existe una resistencia a la transferencia de masa debido a la difusión, el circuito equivalente incluye un elemento denominado impedancia de Warburg, W , en serie con R_{tc} conocido como circuito de Randles y cuya impedancia está dada por:

$$Z_w = \sigma \omega^{-1/2} - j\sigma \omega^{-1/2} \tag{Ecuación XVII}$$

donde:

$$\sigma = \left[\frac{RT}{(nF)^2} \right] \left[\frac{2^{-1/2}}{CD^{1/2}} \right] \tag{Ecuación XIX}$$

suponiendo iguales coeficientes de difusión D de la especie oxidada O y la especie reducida R e igual concentración para ambas especies. En este caso, el gráfico de Nyquist presenta una recta de pendiente +1 en el límite de bajas frecuencias, mientras que en el límite superior de frecuencia los procesos difusionales dejan de tener importancia y el sistema se comporta puramente resistivo como fue descrito anteriormente. Los diagramas pueden deformarse por el peso relativo de la impedancia W , llegando inclusive al punto de no alcanzar a definirse el semicírculo a frecuencias altas cuando el proceso difusional de la especie electroactiva gobierna el proceso global en un amplio intervalo de frecuencias [11, 13].

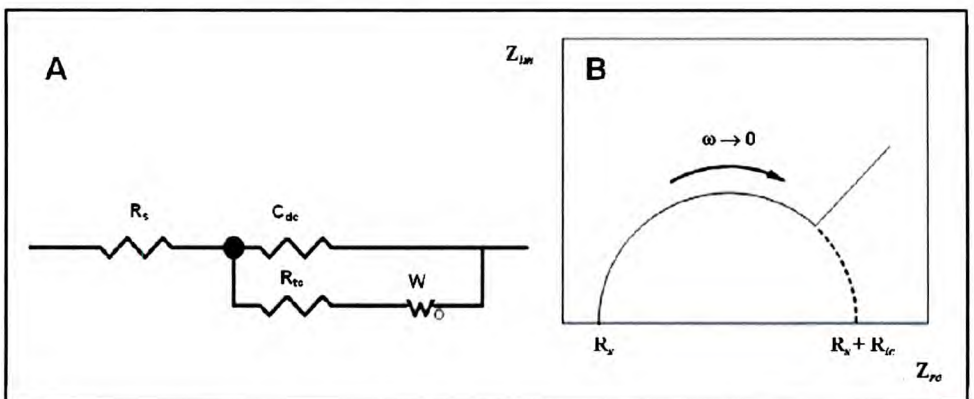


Figura 12. (A) Circuito equivalente de Randles. (B) Diagrama de Nyquist.

1.1.5. Equipamiento utilizado

Las medidas de voltamperometría y amperometría se realizaron con las siguientes estaciones de trabajo: TEQ_02, TEQ_04, Epsilon (BAS) y un potenciostato BAS (modelo CV-37) conectado a un registrador x-y-t Linseis LY 1800. La convección fue controlada con un agitador BAS (modelo Cell Stand C3).

Para la obtención de los espectros de impedancia electroquímica se utilizó un potenciostato/galvanostato Solartron SI 1287 acoplado a un analizador de frecuencias Solartron FRA 1260. Los espectros obtenidos se ajustaron con un programa comercial de simulación y ajuste de circuitos equivalentes (Z_{view} , versión 2.2).

1.2. Microscopías

Las imágenes morfológicas de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas y los compósitos de grafito mostradas en el capítulo III y IV fueron realizadas en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Pilar Herrasti en el Departamento de Química Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

1.2.1. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido, conocida por sus siglas en inglés SEM, utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. En esta técnica se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones y se detectan los electrones reflejados en cada punto. De esta forma, la intensidad medida en cada uno de ellos se emplea para reconstruir una imagen de la muestra. Los electrones incidentes interactúan con los átomos superficiales produciendo señales que contienen información acerca de la topografía superficial, la composición y la conductividad eléctrica entre otras [14].

En la **Figura 13** se muestran distintos tipos de señales que pueden ser producidas cuando un haz de electrones incide en la superficie de una muestra, como lo son los

electrones secundarios, electrones retrodifundidos, retrodispersados o *backscattered*, rayos X característicos, electrones Auger y fotones de varios niveles de energías. Cada una de ellas brinda una información determinada que en forma conjunta da una idea completa tanto de la topología como de la composición y cristalografía de la muestra en estudio [15, 16].

Las imágenes más comunes obtenidas por SEM son a partir de los electrones secundarios extraídos de los orbitales de los átomos superficiales de la muestra. Este tipo de electrones se genera como resultado de dispersiones inelásticas del haz de electrones incidente. Los electrones secundarios tienen bajas energías, menores que 8×10^{-18} J (50 eV) permitiendo obtener información topográfica con muy alta resolución y detalles superficiales de 1 a 5 nm [15].

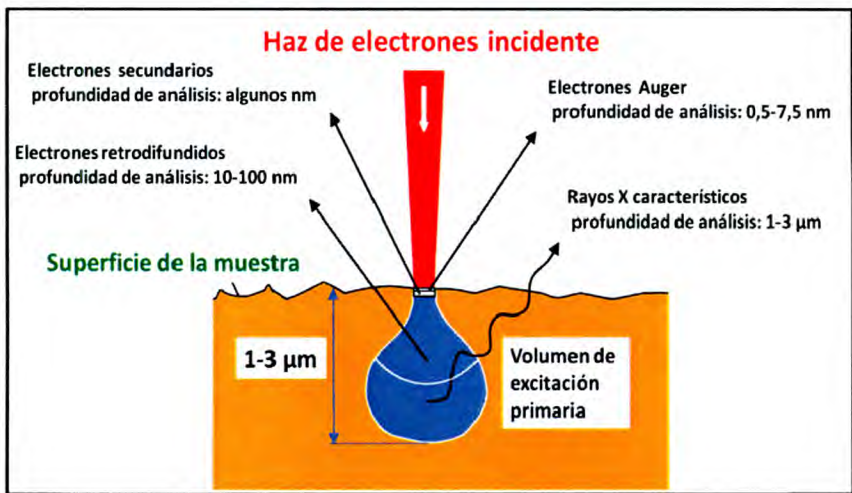


Figura 13. Diagrama del volumen de interacción de los electrones en la muestra y origen de los electrones y rayos X producidos en SEM.

Los electrones retrodifundidos provienen del haz primario reflejado en la muestra por las dispersiones elásticas con los núcleos. Están relacionados con el número atómico, por lo que proveen información sobre la composición de los diferentes elementos distribuidos en la superficie analizada. Los rayos X son formados cuando el haz primario de electrones incide en un electrón de una capa interna de un átomo de la muestra y le otorga energía suficiente para ionizarlo. Una vez que el electrón ha sido removido de la capa interna, un electrón de un orbital de energía superior ocupa el

lugar vacío en el orbital de menor energía, emitiendo el exceso de energía como un fotón de rayos X. Estas energías son características de los elementos constituyentes de la muestras, ya que están cuantizadas, por lo que pueden ser utilizados para estudios de composición y abundancia. Los electrones Auger son señales de muy baja energía, difíciles de recolectar por los detectores convencionales. Esta señal es la que posee menor resolución espacial, por lo que sólo provee información de las capas más externas de la muestra. Su señal está relacionada con el número atómico de los elementos que la componen [15, 17].

Algunas de las ventajas del microscopio de barrido electrónico son su importante poder de resolución, la obtención de aumentos desde 10x hasta 50.000x de forma relativamente sencilla y su gran profundidad de campo que permite obtener imágenes con características tridimensionales. Además, es posible introducir muestras macroscópicas y generar distintos movimientos y/o inclinaciones hasta conseguir la orientación óptima debido a una cámara de vacío. Por otro lado, la generación de distintos tipos de señales, como electrones secundarios, retrodispersados, electrones Auger, rayos X etc., brindan información complementaria sobre las propiedades de la muestra [16].

La principal desventaja de ésta técnica es que la muestra a estudiar debe ser conductora para evitar que se cargue electrostáticamente al irradiarla con el haz de electrones. En caso que no lo fuera, debe ser recubierta con una fina capa metálica [14–16].

Las imágenes de los compósitos de grafito mostradas en el capítulo III y IV fueron obtenidas con un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con un FE-SEM, Zeiss, modelo SIGMA.

1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) es utilizada para la obtención de la información contenida en aquellos electrones que atraviesan una muestra sólida sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente y a gran velocidad. La heterogénea distribución de densidad electrónica presente en la muestra

provoca en la radiación transmitida la formación de imágenes de interferencia, que adecuadamente interpretadas, revelan sus características morfológicas y estructurales [17]. El funcionamiento y equipamiento en esta técnica es similar al de SEM.

Es importante mencionar que la resolución de TEM es mejor que la de SEM, debido a que los electrones transmitidos poseen información de mayor profundidad, es decir de todo el volumen de la muestra.

Las observaciones morfológicas de las nanopartículas electrosintetizadas fueron realizadas por microscopía electrónica de transmisión con un microscopio JEOL-2000 FX operado a 200 KeV.

1.3. Espectroscopias

Estos métodos de análisis que se basan en la medición de la luz y otras formas de radiación electromagnética son los que más se utilizan en la química analítica. A continuación se explica brevemente el fundamento de los métodos espectroscópicos utilizados en el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral: la espectroscopía infrarroja y Raman. Los mismos fueron utilizados para la caracterización espectroscópica en la síntesis química del grafeno funcionalizado presentada en el capítulo VI.

1.3.1. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) es una de las herramientas más poderosas e importantes de la química para identificar y establecer la estructura de las especies orgánicas e inorgánicas. Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en excitaciones en los momentos vibracionales [18].

Los espectros fueron obtenidos con un espectrómetro con transformación de Fourier Nicolet con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas a partir del depósito de una gota de dispersión del material en etanol/agua (1:1) sobre un disco de ZnSe.

1.3.2. Espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar éste ningún tipo de preparación especial y que no genera ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva [5].

Durante la síntesis que se presenta en el capítulo VI los espectros Raman de polvo de grafito, óxido de grafito y grafeno funcionalizado fueron obtenidos usando un espectrómetro Horiba Jobin Yvon LabRam HR equipado con un laser de argón. Dichos espectros fueron colectados a 514,83 nm, utilizando una rendija de 100 μm de ancho y acumulando 20 espectros registrados cada 10 seg.

1.4. Difracción de rayos X

La cristalografía de rayos X es una técnica experimental para el estudio y análisis de materiales basada en el fenómeno de difracción de los rayos X por parte de sólidos en estado cristalino [15].

Esta técnica fue utilizada para caracterizar las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas. Se utilizó un difractómetro X Pet PROPanalytical, con una geometría θ - 2θ , equipado con un monocromador primario y secundario y un detector ultrarrápido X'Ceerator de radiación con CuK (Universidad Autónoma de Madrid, España).

2. Síntesis de los nanomateriales utilizados

2.1. Electrosíntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

La electrosíntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 utilizadas en los experimentos que se describen en los capítulos III, IV y V fue realizada en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Pilar Herrasti en el Departamento de Química Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. La misma se llevó a cabo empleando como ánodo una lámina de hierro con un área de 2 cm^2 (Goodfellow, 99,5% de pureza, y de 0,20 mm de espesor), el cual fue pulido a espejo con alúmina de 0,3 y $0,05 \mu\text{m}$. El electrodo fue lavado con agua MilliQ con la asistencia de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner N-Essler Branson 200). Finalmente, la lámina de Fe fue secada con acetona. Dado que el ánodo es un electrodo de sacrificio, en cada experiencia se empleó un electrodo nuevo [19]. En la **Figura 14** se puede observar un esquema de la celda electroquímica utilizada para la síntesis.

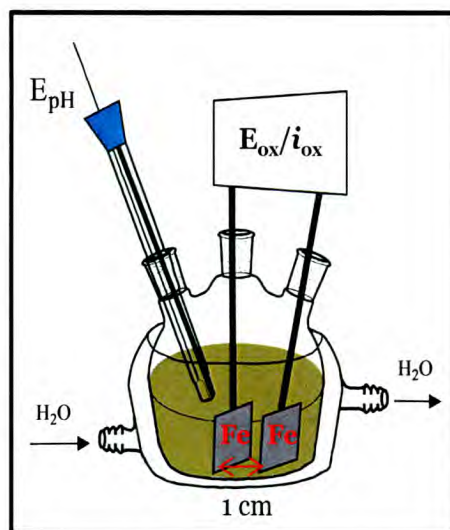


Figura 14. Representación esquemática de la celda electroquímica empleada para la electrosíntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 .

Como cátodo se empleó el mismo material que el electrodo de sacrificio, una lámina de hierro con un área geométrica de 12 cm^2 (Goodfellow, 99,5% de pureza, y

de 0,20 mm de grosor), el cual fue lavado sólo con agua MilliQ con la asistencia de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner N-Essler Branson 200) y secado con acetona antes de ser empleado en cada experiencia [19]. La distancia entre el ánodo y el cátodo fue optimizada en un centímetro. La temperatura de reacción fue ajustada empleando un termostato Julabo F12 a 60 °C. El pH de la solución fue controlado con un electrodo Crison 52-09 colocado tan cerca del ánodo y cátodo como fue posible y utilizando un pH-metro micropH 200. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante todo el tiempo de reacción, con el fin de evitar que el material generado no quede confinado al espacio entre los electrodos. Esto permitió también la homogenización del pH de la solución. El tiempo de reacción fue de 1800 seg [17, 18].

La densidad de corriente aplicada entre los dos electrodos fue de 100 mA/cm². Finalizada la reacción, la disolución fue centrifugada a 5000 r.p.m (centrífuga Emas), para recuperar todo el material sólido, el cual se dejó secar en estufa durante 24 hs a 60 °C [17, 18].

Los electrolitos soporte empleados fueron: cloruro de tetrametilamonio ((CH₃)₄NCl) 0,040 M (Merck, 98%) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio ((CH₃)₃(CH₃(CH₂)₁₅NBr) (Sigma, 98%) [17, 18].

2.2. Síntesis química de grafeno

El polvo de grafito utilizado fue Fisher grado N^o 38, mientras que el aceite mineral fue de Aldrich. Se utilizó ácido ascórbico de Fluka, y el ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio fueron obtenidos de Cicarelli. No se utilizaron purificaciones adicionales para ninguno de los reactivos. Para la preparación de soluciones se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18\text{M}\Omega\text{cm}$) obtenida de un sistema Millipore-MilliQ.

La síntesis de GrO a partir del grafito fue realizada con el método de Hummers [21]. El grafito, el nitrato de sodio y permanganato de potasio fueron mezclados en un vaso de precipitados conteniendo ácido sulfúrico concentrado a 0 °C. Al calentar la mezcla a 35 °C por 120 minutos, ésta se tornó burbujeante, verdosa y viscosa. Cuando dejó de burbujear, cuidadosamente se agregó agua con el objeto de detener la

reacción, observándose un pronunciado incremento de la temperatura. Después de una dilución con agua, la pasta fue mantenida a 80 °C por 60 minutos, la cual cambió su color a pardo. Seguidamente, se agregó peróxido de hidrógeno de forma cuidadosa para formar sulfato de manganeso soluble. La suspensión coloidal de GrO fue separada por filtración en caliente y lavada primero con ácido clorhídrico diluido y luego varias veces con agua ultrapura. El sólido marrón fue resuspendido en agua por ultrasonificación para exfoliar el material. Todos los residuos solubles fueron eliminados por centrifugación.

R-GrO fue obtenido por medio de la reducción de la suspensión acuosa de GrO, agregando el equivalente en masa de AA y manteniendo el sistema a temperatura ambiente por 24 horas [22]. El precipitado negro de R-GrO fue filtrado, lavado con agua y secado a 100 °C por 8 horas. Las diferentes etapas de la síntesis fueron evaluadas a través de espectroscopía FT-IR y Raman. En la **Figura 15** se esquematiza la síntesis química realizada.



Figura 15. Representación esquemática de la síntesis química de R-GrO.

3. Celdas y electrodos utilizados

Se utilizaron celdas de tres electrodos insertos en una tapa de Teflon® como se muestra en la **Figura 16**.

En todos los casos el electrodo de referencia utilizado fue de Ag/AgCl, Cl⁻ 3M, (RE-5B, MF-2052) y el electrodo auxiliar utilizado fue un alambre de Pt como se muestra en la **Figura 17**.

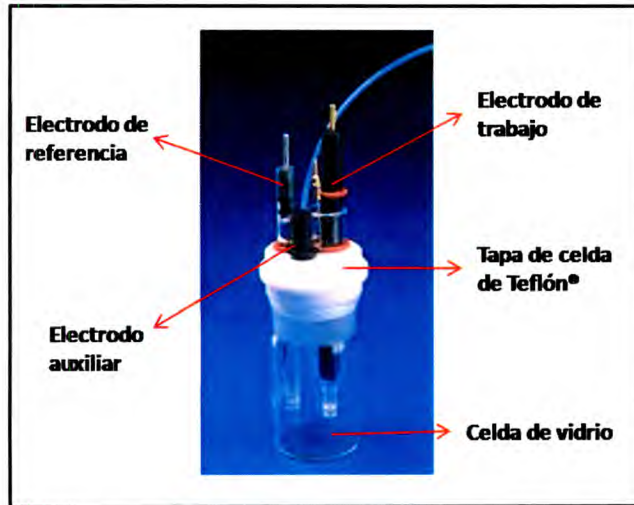


Figura 16. Celda electroquímica empleada.

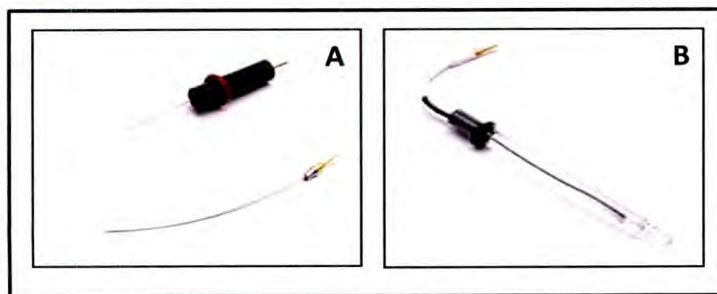


Figura 17. Electrodo auxiliar (A) y de referencia (B).

Como electrodos de trabajo se emplearon materiales carbonáceos. Estos materiales son ampliamente utilizados en electroanálisis, por presentar una amplia ventana de potencial, bajas corrientes de fondo, importante cantidad de grupos funcionales superficiales, mínimo costo y poca reactividad química, lo que los hace muy adecuados para innumerables aplicaciones en (bio)sensores [23].

Mientras que todos los electrodos de carbono comparten la estructura básica de un anillo aromático de seis miembros con uniones sp², difieren en la densidad relativa

de los planos basales y de borde de su superficie. Esta última orientación es más reactiva que el plano basal en cuanto a la transferencia electrónica y a la adsorción. En este sentido, la baja reactividad del plano basal ha sido atribuida a la baja densidad de estados electrónicos y a la falta de grupos funcionales oxigenados y sitios de adsorción [23]. Materiales con distintas relaciones de plano de borde/basal muestran diferentes cinéticas de transferencia electrónica para un dado analito. Se han propuesto una gran cantidad de pretratamientos para incrementar la velocidad de transferencia electrónica en los electrodos de carbono. El tipo de carbono, como también el pretratamiento tienen un efecto muy importante en la respuesta electroanalítica [24].

Un factor general e importante en el uso de electrodos sólidos es la dependencia de la respuesta electroquímica con el estado superficial del electrodo. En este sentido, usualmente se requiere de procedimientos adicionales para mejorar su respuesta. Estos procedimientos adicionales constan de etapas de pulido y otros tratamientos con el objeto de obtener resultados reproducibles y/o una superficie más reactiva, facilitando la transferencia electrónica. La naturaleza del pulido y de los pretratamientos depende del material electródico. Diferentes procedimientos químicos, electroquímicos y térmicos, entre otros, son utilizados para la activación de electrodos construidos con materiales de carbono [2]. Los electrodos de carbono más difundidos son los de carbono vítreo (GCE), compósitos de grafito (CPE) y de carbono vítreo (GCPE), fibras de carbono, grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) y en los últimos años electrodos basados en nanotubos de carbono y grafeno.

Para el desarrollo de los (bio)sensores electroquímicos empleados en este trabajo se utilizaron electrodos compósito de pasta de carbono (CPE), más precisamente de grafito policristalino, modificados convenientemente con nanopartículas de magnetita y grafeno.

3.1. Electrodos compósito de grafito policristalino

Desde el primer trabajo publicado en el año 1958 por Adams [25], los electrodos compósitos de carbono, han sido ampliamente utilizados en electroanálisis. Están

constituidos por una fase conductora, el grafito en polvo, y una fase aislante, el aceite mineral, que cumple la función de aglutinar el material. Dichos electrodos pueden contener en su estructura cristales gráfiticos de diversa naturaleza y tamaños, entre los que se encuentran el grafito en polvo, el grafito espectroscópico, carbono negro o películas pirolizadas. Un factor clave para la aplicación de dichos materiales en electroanalítica es el control de la porosidad.

3.1.1. Origen, estructura y propiedades

El grafito es una de las formas alotrópicas en las que se puede presentar el carbono junto al diamante, los fulerenos, los nanotubos de carbono y el grafeno. A diferencia del diamante, el grafito es un conductor eléctrico y es una de las formas más estables de carbono en condiciones estándar. La gran mayoría de los materiales de grafito policristalino, como el polvo de grafito son sintetizados a partir del calentamiento de fracciones de petróleo de alto peso molecular, en una primera etapa entre 600-800 °C y posteriormente a 2500 °C para producir la grafitización. De esta manera, se producen las láminas de carbono con hibridación sp^2 paralelas entre sí, como se ilustra en la **Figura 18**. Los electrones π deslocalizados dentro de las láminas que lo conforman son los responsables de la conductividad eléctrica del material.

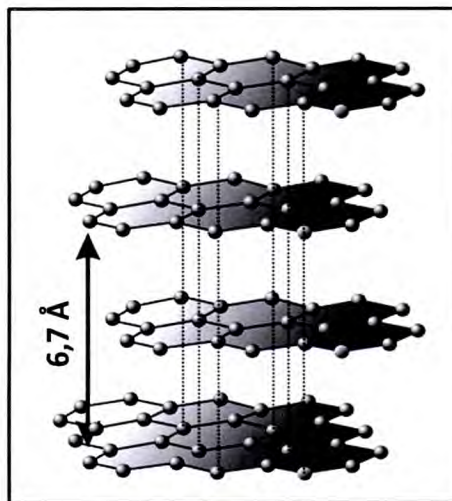


Figura 18. Estructura del grafito mostrando la distancia interplanar.

El grafito policristalino posee una distancia interplanar de 3.35 Å con los ejes de la celda unidad orientados al azar y con un tamaño de celda de entre 50 y 100 Å. Se trata de un material poroso y de baja densidad ($1,8 \text{ g/cm}^3$), por lo que para ser utilizado en electroanálisis deben ser rellenados los intersticios con un material aglutinante para disminuir la resistencia e impedir la entrada de la solución [23].

Una propiedad muy característica del grafito policristalino es su porosidad. Esto provoca importantes corrientes de fondo debido al ingreso de la solución en los intersticios. Es por ello que para aplicar dicho material policristalino en electroanalítica se controla la porosidad rellenando dichos intersticios con un líquido inerte.

3.1.2. Preparación de los electrodos compuesto de grafito policristalino

Una proporción típica de estos compósitos es 70,0 % P/P de grafito en polvo y 30,0 % P/P de aglutinante. La mezcla es preparada en un mortero de ágata para luego empaquetarlo dentro de una cavidad de Teflón® (de 2 a 6 mm de profundidad), realizándose el contacto eléctrico a partir de un tornillo metálico colocado en el extremo posterior del soporte hueco como se muestra en la **Figura 19**.

Un factor muy importante es el empaquetamiento del compuesto en la cavidad, este proceso debe realizarse de forma tal que en la compactación del material electrodo no queden huecos en el interior. Luego de empaquetar firmemente el compuesto se hace girar el tornillo exponiendo una pequeña porción del compuesto, la que es removida manualmente en un papel de pesar al pulir la superficie. De esta forma, se obtiene una superficie electrodo homogénea y relativamente reproducible. La superficie del electrodo resultante se enjuaga con agua Milli-Q antes de cada uso.

Son varios los tipos de polvos de grafito más frecuentemente utilizados para la preparación de este material electrodo, variando los tamaños de partículas que van de 1 a 25 μm . Las partículas de mayor tamaño producen texturas rugosas con características mecánicas y electroanalíticas desfavorables [26]. En estos electrodos es deseable que el tamaño de partícula en la pasta preparada sea lo más uniforme posible, con una alta pureza y baja capacidad de adsorción de oxígeno e impurezas electroactivas. Una propiedad requerida para este componente conductor particulado

es la uniformidad en la distribución de los tamaños. Materiales demasiado porosos como el carbón animal, carbón negro o alguno similar no son adecuados para la preparación de la pasta electrodica [26].

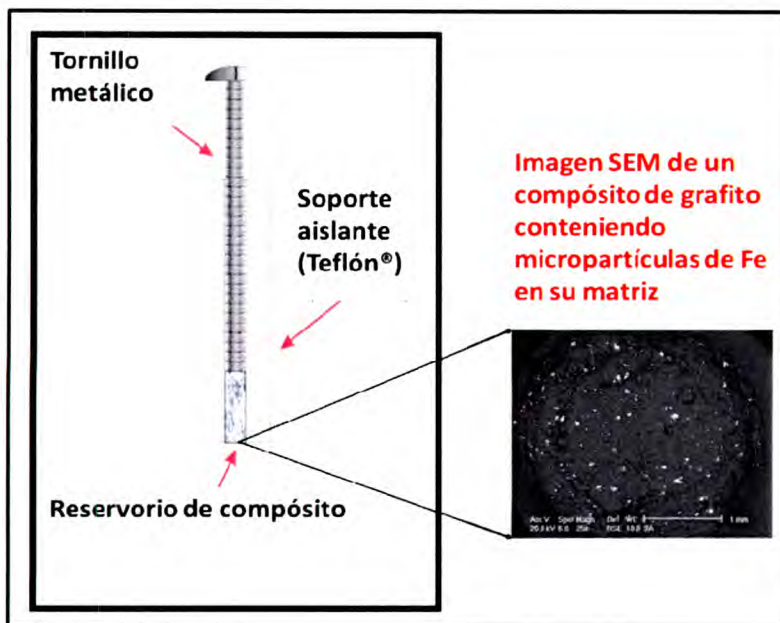


Figura 19. Esquema de un electrodo compuesto de grafito modificado con diferentes sustratos.

El material aglutinante debe ser químicamente inerte y no electroactivo, insoluble en la solución que se analiza y no volátil, además de estar libre de impurezas electroactivas. Se han empleado hidrocarburos alifáticos, parafina, siliconas, ésteres de ácidos orgánicos, compuestos aromáticos. Los compósitos construidos de esta manera exhiben una superficie que está prácticamente recubierta por una muy fina película del líquido aglutinante [1]. En forma general, la presencia de este componente lipofílico no conductor produce una disminución en la velocidad de transferencia de carga, aumentando el sobrepotencial necesario para que ocurran las reacciones de óxido-reducción sobre la superficie. Por otro lado, el carácter hidrofóbico hace dificultoso el acceso de los analitos hidrofílicos a la superficie del electrodo. Ambos efectos hacen que los sistemas adquieran un comportamiento cada vez más irreversible. Por lo tanto, es de suma importancia optimizar las proporciones del material aglutinante para obtener la mejor respuesta [1, 24].

3.1.3. Características de los electrodos compósito de grafito policristalino

Una de las principales características de los CPEs es su gran versatilidad y su construcción sencilla y rápida. Su superficie puede ser rápidamente regenerada a través del pulido manual sobre un papel de pesar. Es posible variar, según las necesidades, su composición, permitiendo por ejemplo la incorporación de diferentes sustancias dentro de su matriz compósita como nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos, tejidos, enzimas, polímeros, cofactores y mediadores, con el objeto de conferir una mayor selectividad y sensibilidad en el proceso electroquímico [25, 26].

La naturaleza heterogénea de los CPEs tiene una gran influencia en la transferencia de carga de las diferentes especies, debido principalmente a la presencia del material hidrofóbico utilizado como aglutinante, por lo que es muy importante establecer las proporciones de carbono y aglutinante para obtener una respuesta óptima en las condiciones en que se realizan los experimentos. El grado de hidrofobicidad de la superficie puede ser reducida mediante pretratamientos tales como la oxidación química o electroquímica de la superficie. Ambos procedimientos generan grupos oxigenados en la superficie de las partículas de carbono policristalino. Estos pretratamientos disminuyen parcialmente la capa lipofílica del ligante que comúnmente recubre estos electrodos, reduciendo la rugosidad y obteniendo, consecuentemente, señales electroanalíticas reproducibles. Los pretratamientos químicos más utilizados para aumentar la hidrofiliidad electroquímica son la oxidación superficial empleando peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio y persulfato de potasio. Si se emplean tratamientos electroquímicos lo más común es realizar una oxidación superficial [24, 27].

Otra consecuencia de la heterogeneidad de los CPEs, es que tienen bajas corrientes de fondo en comparación con otros electrodos de naturaleza carbonácea o metálica. Obviamente, su magnitud aumenta con el incremento de la proporción de aglutinante en la matriz acompañado con una disminución de la sensibilidad del electrodo resultante. La mayoría de los CPEs exhiben corrientes de fondo de alrededor de los 0,2 μA o menos dentro de una amplia ventana de potencial. Los métodos para disminuir las corrientes de fondo se basan en la eliminación de especies electroactivas

adsorbidas, principalmente oxígeno molecular. Antes de la preparación de la pasta es posible calentar el grafito a altas temperatura con la subsecuente impregnación de los poros con parafina, saturación con nitrógeno molecular o reducción con hidrógeno del material carbonáceo pretratado [24, 27].

La propiedad de extraer y adsorber sustancias lipofílicas debido a la presencia del material ligante es una característica de estos materiales compósito. La preconcentración de este tipo de compuestos a partir de la extracción desde la solución resulta ser bastante selectiva, pudiendo mejorarse ajustando el pH del medio.

Esto se debe a que las especies neutras o los pares iónicos pueden ser extraídos por el aglutinante no polar.

Es importante mencionar, también, que la heterogeneidad del material es una desventaja a la hora de trabajar en medios no acuosos, debido a que el material del electrodo se desintegra. Incorporando un surfactante al compósito es posible obtener mayor estabilidad en algunos solventes [26].

3.1.4. Modificación de electrodos compósito de grafito policristalino

Los CPEs ofrecen propiedades muy atractivas para la investigación en (bio)electroquímica de diversas sustancias tanto orgánicas como inorgánicas. Su *performance* electroanalítica resulta interesante con respecto a otros materiales electródicos sólidos, debido fundamentalmente a su naturaleza de compósito, lo que le otorga numerosas ventajas. En este sentido y como se mencionó anteriormente, una de las principales características es que este material electródico puede ser fácilmente modificado mediante la incorporación de diversos sustratos y/o moléculas en la preparación del compósito con el objeto de mejorar el desempeño electroanalítico.

La inmovilización de estos modificadores en los compósitos es generalmente realizada con fines específicos: como pueden ser aumento de la selectividad, acumulación o preconcentración de analitos o (bio)electrocatalisis. Alternativamente, también es posible modificar el electrodo a partir del cubrimiento superficial con barreras permselectivas. El objetivo de esto último es evitar la interferencia de compuestos electroactivos o potencialmente pasivantes de la superficie electródica

que se encuentran frecuentemente presentes en matrices complejas como las biológicas [24, 28].

Los CPEs son divididos en dos categorías: electrodos no modificados y modificados. En la **Tabla 1** se enumeran según su naturaleza, los modificadores más utilizados en CPE.

Modificadores utilizados en CPE		
Químicos	Biológicos	Mediadores
<ul style="list-style-type: none"> •Complejantes •Catalizadores •Surfactantes •Resinas intercambiadoras •Ácidos húmicos •Arcillas •Minerales estructurados •Sílica •Polímeros •Materiales híbridos incluyendo a sólidos meso y nanoestructurados 	<ul style="list-style-type: none"> •Glucosa oxidasa •Tirosinasa •Peroxidasa de rábano •Alcohol deshidrogenasa •Lactato oxidasa •L/D-aminoácido oxidasa •Proteínas •Cofactores •Células •Tejidos 	<ul style="list-style-type: none"> •Ferroceno y derivados •Ftalocianina macrocíclicas •Porfirinas •Bipiridinas •Derivados fenantrólicos •Quinonas y benzoquinonas

Tabla 1. Modificadores utilizados en CPE

En términos generales, la presencia en el compuesto de modificadores químicos tiene como objeto lograr una mejor estabilidad de la pasta carbonácea, mayor reactividad superficial, efecto catalítico, incremento de la selectividad, funcionalización, fluidificación del material electródico, entre otras [29].

En lo referido a los modificadores biológicos incorporados en los compósitos de carbono, los mismos son utilizados para el desarrollo de superficies electródicas con capacidad de biorreconocimiento a fin de aplicarlas en el campo de los biosensores electroquímicos. En este último sentido, si bien las enzimas son las más utilizadas, también es posible recurrir a tejidos vegetales (musgo, alga, tabaco) y frutos como fuente natural de estos biocatalizadores (banana, papa, naranja, pera). También son

utilizados menos frecuentemente hongos, bacterias, virus, macromoléculas naturales (chitosan, queratina) [29].

La presencia de mediadores en la matriz compósito puede mejorar considerablemente la respuesta electrocatalítica en la determinación de muchos compuestos de interés biológico [29].

Han surgido modificadores de última generación, entre ellos se destacan los nuevos alótropos del carbono como los fullerenos, nanofibras, nanotubos de carbono de simple y multipared, y grafeno [29, 30]. Otros de los nuevos materiales destacados son las nanopartículas y sus compósitos nanoestructurados [30–32], los alambres moleculares o nanoalambres [34, 35] y materiales híbridos orgánicos/inorgánicos [35–37].

Es importante mencionar que, dependiendo de su naturaleza, un sustrato o modificador del CPE puede ser incorporado a través de la disolución en el aglutinante para posteriormente incorporar el grafito y luego homogenizar mecánicamente el compósito resultante o directamente ser mezclado en el compósito de grafito y aglutinante previamente preparado.

En este trabajo de tesis doctoral, en la preparación de los CPEs modificados con distintas proporciones de nanopartículas de Fe_3O_4 y/o proteínas o R-GrO, se conservó el 30,0 % P/P del aglutinante y se ajustó el porcentaje de grafito a expensas del correspondiente al modificador.

El procedimiento utilizado para la preparación de los CPEs modificados fue primeramente a través de la dispersión del nanomaterial en el aceite mineral. Seguidamente se agregó el grafito y se procedió de la misma forma que con CPE no modificado. Para los compósitos conteniendo nanopartículas y proteínas en su matriz, luego de la dispersión de Fe_3O_4 en el aceite mineral se incorporó la biomolécula. En todos los casos, se empaquetó una pequeña porción del compósito en una cavidad de 3,0 mm de un tubo de Teflón® como el mostrado en la **Figura 19**. Cada nueva superficie se obtuvo puliendo el electrodo sobre una hoja de papel de pesar y lavando con agua ultra pura Milli-Q antes de cada experimento. Los compósitos conteniendo proteínas en su matriz fueron almacenados a 4 °C.

4. Bibliografía

- [1] J. M. Pingarrón, P. S. Batanero, *Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid, España: Síntesis, 1999.
- [2] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, vol. 3. New York, USA: John Wiley and Sons, 2000.
- [3] A. J. Bard, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. Republic of Singapore: John Wiley, 1980.
- [4] R. S. Nicholson, "Some Examples of the Numerical Solution of Nonlinear Integral Equations," *Anal. Chem.*, vol. 36, Nro. 6, pp. 667–671, 1965.
- [5] C. M. A. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. New York, USA: Bookcraft, 1992.
- [6] E. P. Parry, "Evaluation of Analytical Pulse Polarography," *Anal. Chem.*, vol. 37, pp. 1634–1637, 1965.
- [7] L. gg Lan, Y. Luo H. Ren, X. Wang, Y. Wang, "Glassy Carbon Electrode Modified with Citrate Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive Arsenic (III) Detection," *Anal. Lett.*, vol. 45, Nro. 10, pp. 1184–1196, 2012.
- [8] E. Giacomino, A. , Abollino, O., Lazzara, M., Malandrino, M., Mentasti, "Determination of As(III) by anodic stripping voltammetry using a lateral gold electrode: Experimental conditions, electron transfer and monitoring of electrode surface," *Talanta*, vol. 25, Nro. 5, pp. 1428–1435, 2011.
- [9] V. Herzog, G. Beni, "Stripping voltammetry at micro-interface arrays: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 769, pp. 10–21, 2013.
- [10] D. Herzog, G. Arrigan, "Determination of trace metals by underpotential deposition-stripping voltammetry at solid electrodes," *Trends Anal. Chem.*, vol. 24, Nro. 3, pp. 208–217, 2005.
- [11] E. R. G. H. M. Villullas, E. A. Ticianelli, V. A. Macagno, *Electroquímica: Fundamentos y aplicaciones en un enfoque interdisciplinario*. Córdoba, Argentina: Ed. Secretaría de Extensión Universitaria, Universidad Nacional de Córdoba, 2000.
- [12] O. E. L. Pérez, "Electroformación de películas de óxidos. Aplicaciones como materiales para capacitores electroquímicos," *Tesis Dr. Univ. Nac. Cordoba*, 2006.

- [13] C. M. J.-P. Diard, B. Le Gorrec, *Handbook of Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Bio-Logic, 2013.
- [14] H. Y. J. I. Goldstein, *Practical Scanning Electron Microscopy*. American Association of Physicists in Medicine, 1979.
- [15] J. R. M. Goldstein, Joseph, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, Charles E. Lyman, Eric Lifshin, Linda Sawyer, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Tercera ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC, 2003.
- [16] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Department of Physics, University of Alberta 412 Avadh Bhatia Physics Laboratory Edmonton, Alberta, Canada: Springer, 2005.
- [17] D. B. Williams and C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. New York, USA: Springer, 2009.
- [18] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Segunda ed. New York, USA: CRC Press Taylor and Francis Grup, 2011.
- [19] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M. P. Morales, and P. Herrasti, "Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization," *Electrochim. Acta*, vol. 53, Nro. 8, pp. 3436–3441, 2008.
- [20] L. Cabrera, "Síntesis electroquímica y caracterización de nanopartículas de magnetita. Generación de materiales híbridos," *Tesis Dr. Univ. Autónoma Madrid-Universidad Guanajuato*, 2008.
- [21] R. Willams Hummers, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, p. 1339, 1958.
- [22] S. G. J. Zhang, H. Yang, G. Shen, P. Cheng, J. Zhang, "Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid," *Chem. Commun.*, vol. 46, pp. 1112–1114, 2010.
- [23] R. L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 7, pp. 2646–2687, 2008.
- [24] W. R. H. Peter T. Kissinger, "Carbon Electrodes," in *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, Revised and Expanded*, Segunda ed., New York, USA: Marcel Dekker, 1996.
- [25] R. N. Adams, "Carbon Paste Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 30, Nro. 9, pp. 1576–1576, 1958.

- [26] A. Chemie, B. Triomphe, L. Cruces, C. Republic, and R. March, "Sensors Based on Carbon Paste in Electrochemical Analysis," *Electroanalysis*, vol. 7, Nro. 1, pp. 5–22, 1995.
- [27] I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, "Carbon paste electrodes in the new millennium," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 7, Nro. 4, pp. 598–656, 2009.
- [28] L. Gorton, "Carbon Paste Electrodes Modified with Enzymes, Tissues, and Cells," *Electroanalysis*, vol. 7, Nro. 1, pp. 23–45, 1994.
- [29] I. Švancara, K. Vytřas, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, "Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis," *Electroanalysis*, vol. 21, Nro. 1, pp. 7–28, 2009.
- [30] S. A. Zaidi, "Graphene: A Comprehensive Review on Its Utilization in Carbon Paste Electrodes for Improved Sensor Performances," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 8, pp. 11337–11355, 2013.
- [31] G.-H. Zhao, W.-X. Dong, H.-B. Zhang, W.-P. Cui, "Application of carbon nanotubes in modified oxidase biosensors," *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.*, vol. 12, Nro. 19, pp. 3793–3795, 2008.
- [32] M. Parvin, M.H Golivand, M.B. Najafi, M. Shariaty, "Carbon paste electrode modified with cobalt nanoparticles and its application to the electrocatalytic determination of chlorpromazine," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 31, Nro. 36, pp. 31–36, 2012.
- [33] M. Arvand, M. Dehsaraei, "A gold nanoparticles-modified carbon paste electrode for uric acid determination in human urine without pretreatment steps," *Anal. Bioanal. Electrochem.*, vol. 5, Nro. 4, pp. 439–454, 2013.
- [34] G. Reddaiah, K., Reddy, T.M., Mallikarjuna, K., Narasimha, "Electrochemical detection of dopamine at poly(solochrome cyanine)/Pd nanoparticles doped modified carbon paste electrode and simultaneous resolution in the presence of ascorbic acid and uric acid: A voltammetric method," *Anal. Methods*, vol. 5, Nro. 20, pp. 5627–5636, 2013.
- [35] M. Mashhadizadeh, M.H., Akbarian, "Voltammetric determination of some anti-malarial drugs using a carbon paste electrode modified with Cu(OH)₂ nano-wire," *Talanta*, vol. 78, Nro. 4–5, pp. 1440–1445, 2009.
- [36] H. Wang, Z., Liu, G. , Zhang, L., Wang, "Electrochemical detection of trace cadmium in soil using a Nafion/stannum film-modified molecular wire carbon paste electrodes," *Ionics (Kiel)*, vol. 19, Nro. 11, pp. 1687–1693, 2013.

- [37] S. Chitravathi, B. E. K. Swamy, G. P. Mamatha, B. S. Sherigara, "Electrochemical behavior of poly (naphthol green B)-film modified carbon paste electrode and its application for the determination of dopamine and uric acid," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 667, pp. 66–75, 2012.
- [38] A. Sánchez, S. Morante-Zarcero, D. Pérez-Quintanilla, I. Del Hierro, I. Sierra, "A comparative study on carbon paste electrodes modified with hybrid mesoporous materials for voltammetric analysis of lead (II)," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 689, pp. 76–82, 2013.
- [39] X. Wang, E. Wang, C. Hu, "Hybrid inorganic-organic material containing 12-molybdophosphate bulk-modified carbon paste electrode," *Chem. Lett.*, Nro. 10, pp. 1030–1031, 2001.

*“Todos los enemigos de la diferenciación
vienen a serlo del progreso”.*
José ingenieros.

Capítulo III

***Compósitos de grafito modificados
con nanopartículas de Fe_3O_4
electrosintetizadas***

1. Introducción

Desde el primer trabajo publicado en el año 1958 por Adams [1] hasta la fecha, los electrodos compósitos de carbono, han sido ampliamente utilizados en electroanálisis, debido a las múltiples ventajas que ofrecen. Entre ellas puede mencionarse su versatilidad, simple y rápida preparación, superficie electrodo fácilmente renovable, baja toxicidad e inercia química [2]. En cuanto a la detección de peróxido de hidrógeno se requieren altos sobrepotenciales para la oxidación y la reducción del peróxido de hidrógeno sobre electrodos de carbono. Esto último compromete la selectividad de la determinación de dicho analito en muestras biológicas ante la presencia de compuestos fácilmente oxidables como ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) y paracetamol (PCTM) [3–6]. Es necesario, entonces diseñar estrategias que permitan disminuir estos sobrepotenciales para poder cuantificar el peróxido de hidrógeno sin interferencia. En los últimos años han surgido numerosas alternativas para detectar selectivamente el peróxido de hidrógeno [7–16]. Entre la más destacada está la utilización del “azul de Prusia” como peroxidasa artificial, el cual posee actividad electrocatalítica hacia la reducción del peróxido de hidrógeno, haciendo posible su detección a bajos sobrepotenciales [22, 23]. Otra estrategia ha sido la incorporación de partículas metálicas en los compósitos de carbono. Se ha demostrado que estas partículas participan activamente como catalizadores produciendo una mejora en la óxido-reducción de diversas sustancias de interés clínico, industrial y ambiental [9–18]. La modificación de los electrodos compósitos de carbono con partículas metálicas como rodio, cobre, platino, oro o combinaciones de ellos [9–19], óxidos de metales tales como cobre y manganeso [20–23] y perovskitas [17] han demostrado ser útiles para la detección electrocatalítica de peróxido de hidrógeno a potenciales cercanos a 0 V. Modificando la superficie de electrodos sólidos por medio de múltiples estrategias y aprovechando la sinergia que se obtiene al combinar nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, biomoléculas y polímeros con nuevos materiales como los nanotubos de carbono y grafeno, se logra mejorar la transferencia electrónica e incrementar considerablemente la respuesta electroquímica de peróxido de hidrógeno [25–30].

Chen y colaboradores propusieron un biosensor para glucosa, dispersando nanotubos de carbono y nanopartículas de Fe_3O_4 obtenidas por coprecipitación, en un compósito con GOx entrecruzada con glutaraldehído. Los autores asignaron a los nanotubos de carbono la actividad catalítica hacia el peróxido de hidrógeno enzimáticamente generado [31]. Chumming y Xiangqin demostraron los efectos catalíticos de las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas químicamente y cubiertas con azul de Prusia, en la óxido/reducción del peróxido de hidrógeno [32]. Lin y Le describieron la electrocatálisis hacia peróxido de hidrógeno debido a la inmovilización mediante "drop-coating" de nanopartículas de Fe_3O_4 químicamente sintetizadas y dispersas en quitosano sobre un electrodo de carbono vítreo [33]. Bencsik y colaboradores analizaron el comportamiento electrocatalítico hacia la reducción de peróxido de hidrógeno de películas delgadas de un compósito de polipirrol y nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas por coprecipitación, electrodepositadas sobre un electrodo de platino [34]. También se han desarrollado sensores para peróxido de hidrógeno a través del ensamblado capa por capa y por medio de interacción electrostática entre polidialildimetilamonio y nanopartículas de Fe_3O_4 generadas químicamente [51, 39]. Otro esquema de funcionalización de estas nanopartículas de Fe_3O_4 químicamente sintetizadas, ha sido mediante el uso de grafeno con el objeto de promover una mejor transferencia de carga, aprovechando el efecto sinérgico de ambos nanomateriales [41, 44, 53]. Hrbac y colaboradores compararon la respuesta electrocatalítica hacia la reducción del peróxido de hidrógeno a pH 3,0, de electrodos de pasta de grafito modificados con nanopartículas de distintos óxidos de hierro (III) tales como hematita, maghemita, Fe_2O_3 amorfo, β - Fe_2O_3 , magnetita y ferrihidrita [38]. Los autores demostraron que la mejor catálisis es la obtenida con las nanopartículas del óxido férrico amorfo y la respuesta a pH neutro es incluso mejor que para el caso del azul de Prusia.

En este trabajo se propone por primera vez el diseño y caracterización de compósitos de grafito modificados con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) electroquímicamente generadas. Como se mencionó en el capítulo II, Fe_3O_4 es un óxido de hierro mixto donde coexisten Fe^{+2} y Fe^{+3} , [39, 40]. El método convencional para obtener nanopartículas de Fe_3O_4 es mediante coprecipitación, obteniéndose gran

polidispersión poblacional de tamaños y una fuerte agregación del nanomaterial. La síntesis por vía electroquímica permite la obtención de nanopartículas monodispersas mediante el control del potencial o la corriente, evitando la agregación al utilizar surfactantes amónicos como electrolito soporte en la síntesis [41]. A continuación se presentan las ventajas de dispersar dichas nanopartículas electrosintetizadas en compósitos de carbono, con el objetivo de desarrollar una plataforma sensible y selectiva hacia peróxido de hidrógeno para su futura aplicación como transductor en un biosensor electroquímico de glucosa. La optimización de la plataforma se basó en el estudio de su respuesta electroquímica utilizando diferentes marcadores rédox.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Se empleó peróxido de hidrógeno 30% V/V Baker. Las concentraciones de las soluciones estándar de peróxido de hidrógeno fueron controladas por titulación con $KMnO_4$. AU, cloruro de tetrametil amonio y bromuro de hexadeciltrimetil amonio fueron de Merck y AA de Fluka. PCTM fue provisto por la Asociación Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica (A.N.M.AT). Se utilizó polvo de grafito Fisher grado N^o 38 y aceite mineral de Aldrich. Todos los reactivos fueron de grado analítico y se emplearon sin purificaciones adicionales. Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18M\Omega cm$) obtenida de un sistema Millipore-MilliQ. Como electrolito soporte se utilizó "buffer" fosfato 0,050M pH 7,40.

2.2. Instrumental

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato TEQ_02. Como electrodos de trabajo se utilizaron los diferentes compósitos de grafito modificados

con Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4) y sin modificar (CPE), empaquetados firmemente en una cavidad de teflón de 3,0 mm de diámetro.

La preparación de los electrodos de trabajo fue descrita en el capítulo II. Las medidas amperométricas fueron realizadas con transporte convectivo utilizando un agitador magnético en “buffer” fosfato 0,050 M pH 7,40 aplicando el potencial de trabajo y esperando hasta que la corriente alcance el estado estacionario para efectuar la adición del analito en la celda electroquímica.

Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron entre -0,200 V y +0,800 V a 0,100 V/s. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas

Las nanopartículas de Fe_3O_4 fueron caracterizadas utilizando TEM y XRD. En la **Figura 1A**, se presenta una micrografía obtenida por TEM donde se puede observar la morfología cuasi-esferoidal que presentan las partículas, identificadas como Fe_3O_4 por rayos X. A partir de este tipo de micrografías se calculó un diámetro promedio de las partículas de (20 ± 4) nm. En la **Figura 1B** se muestra el difractograma obtenido a partir del material electrosintetizado.

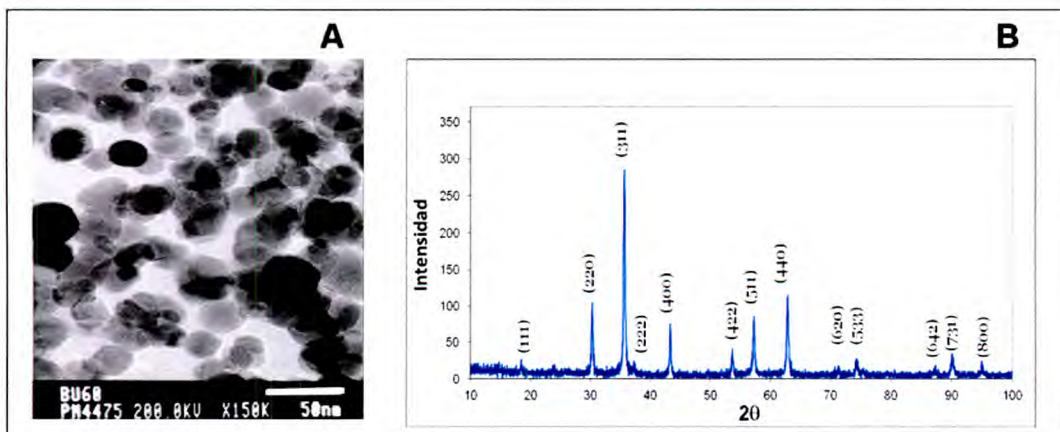


Figura 1. Micrografía TEM (A) y difractograma (B) de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas. Condiciones de síntesis: Electrolito soporte: $(CH_3(CH_2)_3)_4NBr$ 0,040 M, $i = 100mA/cm^2$, $T = 60$ °C y $t = 1800$ s.

En la **Tabla 1** se presentan los valores 2θ correspondientes a los distintos picos del difractograma, indexándolos a los planos cristalinos (h k l). Todas las líneas de difracción corresponden a Fe_3O_4 (código de referencia del Centro Internacional de datos de Difracción: JCPDS 01-088-0315). Como se mencionó en el capítulo II, la presencia del tensioactivo amoniacal adsorbido electrostáticamente sobre la superficie de las partículas evita la agregación entre ellas, además de conferir uniformidad poblacional en los tamaños obtenidos. Al variar el tensioactivo o la concentración del mismo durante la electrooxidación no se observó ninguna diferencia apreciable en los diagramas de difracción. Se demuestra también la ausencia de impurezas como el hierro metálico (α -Fe); que presenta un pico de difracción a $2\theta = 44,7^\circ$, correspondiente al plano (1 1 0).

2θ	h k l
18,43	1 1 1
30,30	2 2 0
35,64	3 1 1
37,22	2 2 2
43,3	4 0 0
53,56	4 2 2
57,22	5 1 1
62,80	4 4 0
71,11	6 2 0
74,36	5 3 3
87,05	6 4 2
90,07	7 3 1
94,95	8 0 0

Tabla 1. Indexación de los picos de difracción de la **Figura 1B**.

3.2. Caracterización electroquímica de CPE- Fe_3O_4 empleando diversos marcadores rédox

Con el fin de de seleccionar las condiciones óptimas, en cuanto a la cantidad de nanopartículas de Fe_3O_4 presente en el compósito, se evaluó la respuesta

electroquímica de peróxido de hidrógeno, AA, AU y PCTM. Para ello, se realizaron estudios comparativos entre los electrodos modificados con distintas proporciones de nanomaterial.

3.2.1. Respuesta electroquímica de peróxido de hidrógeno

La **Figura 2** compara la respuesta voltamperométrica de peróxido de hidrógeno sobre CPE y CPE modificado con distintas proporciones de Fe_3O_4 electrosintetizadas en presencia de cloruro de tetrametilamonio.

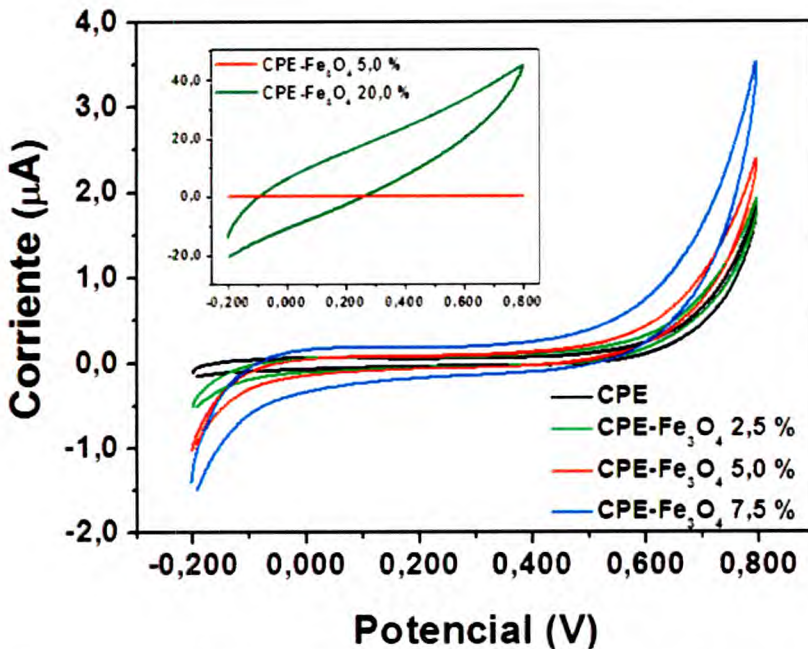


Figura 2. Voltamperogramas cíclicos para peróxido de hidrógeno 0,050 M sobre CPE y CPE- Fe_3O_4 conteniendo diferentes cantidades de magnetita. Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40. Velocidad de barrido 0,100 V/s.

Como puede observarse, la presencia de las nanopartículas produce una significativa disminución de los sobrepotenciales tanto de oxidación como de reducción del peróxido de hidrógeno. Sobre CPE, la oxidación del peróxido de hidrógeno comienza aproximadamente a 0,5 V y la reducción a -0,1 V en tanto que sobre los electrodos modificados con Fe_3O_4 la oxidación comienza aproximadamente a

0,4 V y la reducción a 0,1 V. Las corrientes asociadas a ambos procesos, también evidencian un incremento significativo en los electrodos modificados. A partir de los resultados obtenidos, queda claro que la presencia de las nanopartículas en el compósito produce un efecto electrocatalítico hacia la oxidación y reducción del peróxido de hidrógeno, siendo mucho más marcado sobre éste último proceso.

En la **Tabla 2** se presentan, los valores de corriente obtenidos a -0,100 y +0,700 V para las diferentes proporciones de electrocatalizador hallados a partir de los experimentos de voltamperometría cíclica mostrados en la **Figura 2**, así como la relación de estas corrientes respecto de las obtenidas en ausencia de Fe_3O_4 . Nótese, por ejemplo, que para un electrodo conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 , las corrientes obtenidas a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno superan en un factor de 7,9 a CPE, y en apenas un factor de 1,6 para la oxidación del marcador.

Por otro lado, y como se muestra en el gráfico insertado de la **Figura 2**, es importante destacar que un incremento de Fe_3O_4 por encima de 5,0 % P/P en los compósitos produce una respuesta resistiva debido a la pobre aglutinación de la matriz carbonácea y la naturaleza no conductora de las nanopartículas. A esto hay que añadir la gran dificultad mecánica para empaquetar la pasta en el electrodo debido a su consistencia y para obtener superficies reproducibles a través del pulido. Estos resultados demuestran que tanto la respuesta electroquímica como la consistencia del compósito, poseen una fuerte relación con la cantidad de nanopartículas y que es necesario modificar los compósitos con proporciones menores que 7,5 % P/P de Fe_3O_4 .

Contenido de Fe_3O_4 en CPE (% P/P)	$I_{(-0,100\text{ V})}$ (μA)	$I_{(0,700\text{ V})}$ (μA)	$\frac{I_{(-0,100\text{ V})} \text{ CPE-Fe}_3\text{O}_4 \text{ X \%}}{I_{(-0,100\text{ V})} \text{ CPE}}$	$\frac{I_{(0,700\text{ V})} \text{ CPE-Fe}_3\text{O}_4 \text{ X \%}}{I_{(0,700\text{ V})} \text{ CPE}}$
0,0 %	0,026	0,539	-----	-----
2,5 %	0,108	0,700	4,2	1,3
5,0 %	0,204	0,888	7,9	1,6
7,5 %	0,290	1,303	11,2	2,4

Tabla 2. Corrientes de reducción y oxidación de peróxido de hidrógeno a -0,100 y +0,700 V respectivamente, obtenidas a partir de los voltamperogramas mostrados en la **Figura 2**.

Se realizaron experimentos de voltamperometría hidrodinámica sobre las distintas plataformas electrónicas, con el objeto de determinar con mayor exactitud el potencial de trabajo para la realización de las determinaciones amperométricas. En la **Figura 3** se muestran los voltamperogramas hidrodinámicos para peróxido de hidrógeno 0,050 M sobre CPE y CPE conteniendo 2,5 y 5,0 % P/P de Fe_3O_4 . Las ventajas del efecto electrocatalítico de Fe_3O_4 hacia la óxido-reducción del peróxido de hidrógeno son evidentes. En comparación con CPE, se observa que para CPE modificados con Fe_3O_4 , existe una disminución de los sobrepotenciales de oxidación y de reducción de 0,100 V y de 0,300 V para los compósitos conteniendo 2,5 y 5,0 % P/P de nanopartículas respectivamente.

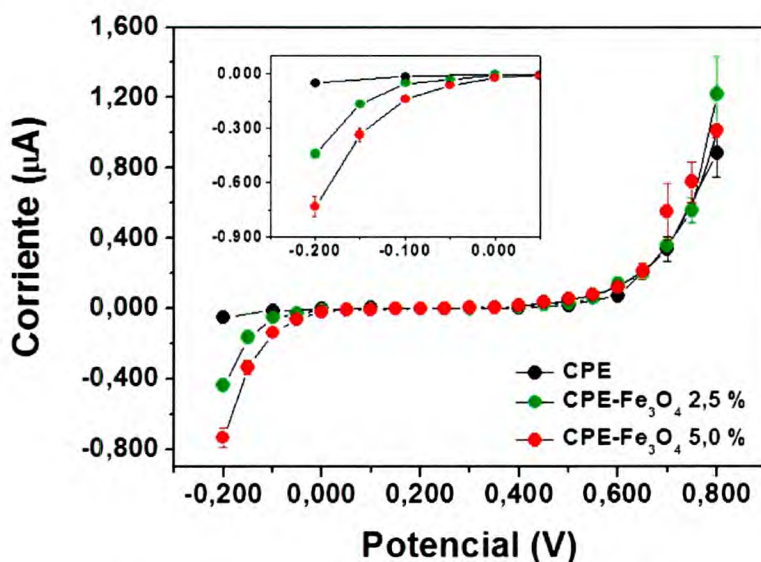


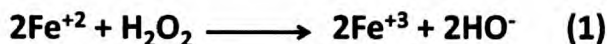
Figura 3. Voltamperogramas hidrodinámicos para peróxido de hidrógeno 0,050 M obtenidos sobre CPE y CPE- Fe_3O_4 conteniendo diferentes cantidades de Fe_3O_4 . En el gráfico insertado se muestra en escala ampliada el intervalo de potenciales de reducción. Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40.

Es importante enfatizar en el incremento de las corrientes involucradas en la reducción del peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, las corrientes de reducción obtenidas a -0,100 V son cuatro y diez veces mayores para los electrodos conteniendo 2,5 y 5,0 % P/P de nanopartículas respectivamente en comparación con CPE.

El mejor compromiso entre sensibilidad y ruido de la señal, fue el que se obtuvo a -0,100 V, el cual fue seleccionado como potencial de trabajo. A pesar de que se hallaron señales más importantes a sobrepotenciales más negativos, la desventaja

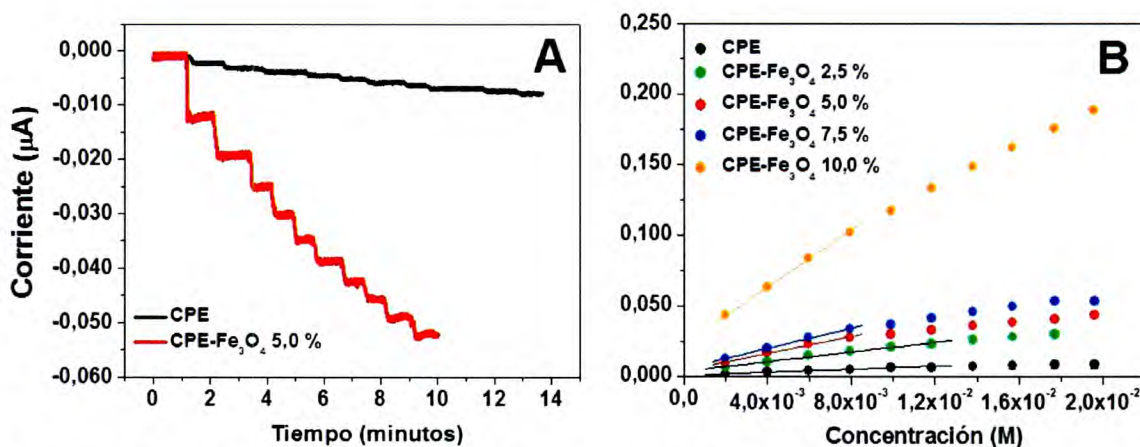
principal fue que estas señales presentaron un alto nivel de ruido, necesitando además, tiempos prolongados para estabilizar la línea de base.

Lin y Leu propusieron que el mecanismo catalítico que tiene lugar en la reducción del peróxido de hidrógeno [29] sobre electrodos modificados con Fe_3O_4 involucra las siguientes reacciones:



Magnetita posee un centro catalítico que es Fe^{+2} , el cual en una primera etapa, es oxidado por el peróxido de hidrógeno generando Fe^{+3} (1), el cual seguidamente, al potencial de trabajo aplicado, es reducido a Fe^{+2} (2), originando una respuesta catalítica.

En la **Figura 4A** se presenta la respuesta amperométrica sobre CPE y CPE conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P) a -0,100 V para adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M. La **Figura 4B** muestra las curvas de calibración obtenidas a partir de los registros amperométricos para CPE y CPE conteniendo 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 % P/P de Fe_3O_4 y en la **Tabla 3** se presentan las respectivas sensibilidades.



Los resultados confirman que existe una relación directa entre la cantidad de nanopartículas y la sensibilidad para la reducción del peróxido de hidrógeno debido al incremento de los sitios electrocatalíticos disponibles en la superficie del electrodo. Por este motivo se escogió como composición óptima un 5,0 % P/P de Fe_3O_4 ya que es la que posee el mejor compromiso entre la relación señal-ruido, corriente capacitiva, sensibilidad, estabilidad de la señal y el tiempo de espera para obtener la línea de base.

Contenido de Fe_3O_4 en CPE (% P/P)	Sensibilidad a peróxido de hidrógeno ($\mu A.M^{-1}$)
0,0	(0,5 ± 0,2)
2,5	(1,71 ± 0,08)
5,0	(3,0 ± 0,3)
7,5	(3,6 ± 0,2)
10,0	(8,2 ± 0,2)

Tabla 3. Sensibilidades a 0,-100 V obtenidas de las curvas de calibración mostradas en la **Figura 4B**.

Si se compara la sensibilidad obtenida con las encontradas en otros trabajos [31–37] éstas son superiores a las reportadas aquí, pero es importante aclarar que los sobrepotenciales de trabajo propuestos para la determinación amperométrica del peróxido de hidrógeno son menores que -0,100 V. Por otro lado y teniendo en cuenta que el compósito modificado fue almacenado a temperatura ambiente, la estabilidad obtenida con CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P es superior en comparación con los trabajos antes mencionados, ya que a los 6 meses la sensibilidad obtenida se mantuvo en un 100 % respecto de su valor inicial. Es importante mencionar también, que CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P demostró una rápida respuesta, ya que a los 3 segundos de la inyección del analito en la celda, se alcanza el 90% de la misma. Este parámetro es significativamente inferior respecto al reportado por otros autores [31–37].

A fin de determinar las propiedades eléctricas de CPE y CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P, se llevaron a cabo mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica. En esta sección se analiza el comportamiento electroquímico de las plataformas en una

solución de peróxido de hidrógeno $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ entre 10 KHz y 10 mHz, a un potencial de trabajo de $-0,100 \text{ V}$ y con una perturbación de $0,010 \text{ V}$. En la **Figura 5** se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos sobre CPE (negro) y CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P (rojo) a partir de espectros de impedancia. Para ambos casos, en trazo continuo se grafica el ajuste obtenido a partir de los datos experimentales según los modelos de circuito eléctrico mostrados.

En los diagramas de Nyquist para CPE se observa un semicírculo, presentando una única constante de tiempo. Los datos experimentales fueron ajustados de manera satisfactoria con el circuito equivalente $R_s(R_{tc}C_{dc})$. Con el objeto de correlacionar el modelo propuesto con la celda electroquímica, es necesario asignarle a cada componente eléctrico algún proceso físico. Sus componentes representan la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}), que está en paralelo con la capacitancia de la doble capa (C_{dc}), los cuales a su vez se encuentran en serie con la resistencia eléctrica de la solución (R_s).

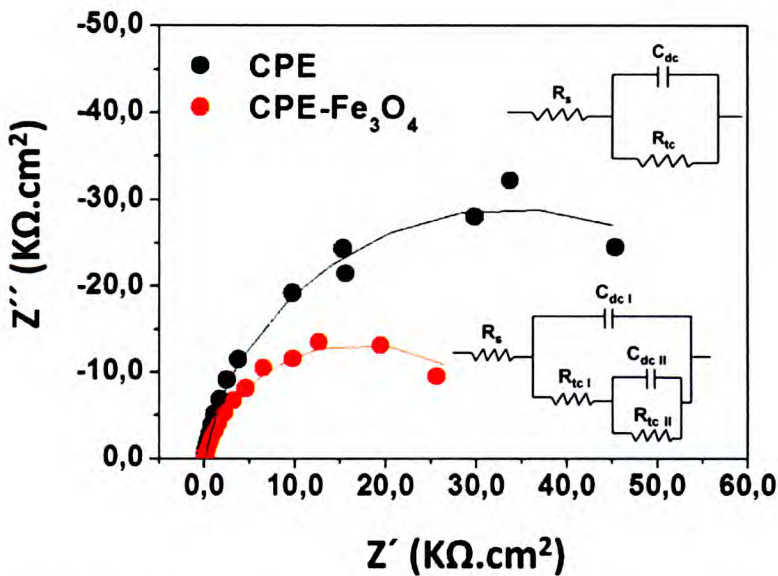


Figura 5. Diagramas de Nyquist obtenidos a partir de experimentos de espectroscopía de impedancia electroquímica sobre CPE y CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P. El trazo continuo en cada espectro indica los ajustes correspondientes. Condiciones experimentales: peróxido de hidrógeno $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$. $E: -0,100 \text{ V}$. Intervalo de frecuencia: $1,0 \times 10^{-2} \text{ Hz}$ a $1,0 \times 10^4 \text{ Hz}$. Amplitud: $0,010 \text{ V}$.

Si se trata de efectuar el ajuste de los datos experimentales para CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P con el circuito equivalente $R_s(R_{tc}C_{dc})$, no se encuentra una buena correlación y el semicírculo es menos definido y distorsionado (no mostrado). Esto podría dar cuenta de la existencia de más de una constante de tiempo, lo cual estaría relacionado a una superficie con diferentes reactividades tal como se explicó en el capítulo II. La presencia del nanomaterial y su efecto electrocatalítico hacia el marcador, da cuenta de esta descarga electrónica diferenciada. De esta forma, la respuesta obtenida sobre CPE modificado con Fe_3O_4 puede ser interpretada y ajustada según el circuito eléctrico equivalente que presenta dos constantes de tiempo, mostrado en la **Figura 5**. En este caso, la interpretación física de la distribución de los elementos eléctricos está directamente asociada con el sistema real, ya que debido a la presencia de las nanopartículas en el compósito, hay una nueva superficie con distinta reactividad. Es por esto que se agregan al circuito antes descrito, dos componentes en paralelo entre sí, una segunda resistencia a la transferencia de carga (R_{tc} II) y una capacitancia de la doble capa (C_{dc} II), ambos en serie respecto a R_{tc} I.

Del análisis de los espectros mostrados en la **Figura 5** se puede concluir que la presencia de Fe_3O_4 5,0 % P/P en CPE facilita la transferencia electrónica debido a que la R_{tc} es menor que la obtenida sobre CPE. A partir del ajuste de los datos experimentales los valores de R_{tc} obtenidos fueron $(6 \pm 2) \times 10^1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ para CPE y $(3,4 \pm 0,7) \times 10^1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ para CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P, quedando en clara evidencia la actividad electrocatalítica de las nanopartículas hacia el peróxido de hidrógeno.

Adicionalmente, en la **Figura 6** se muestra la influencia de la cantidad de nanopartículas de Fe_3O_4 incorporadas en CPE en la R_{tc} . La barra en negro representa el valor obtenido para CPE y las barras en rojo las R_{tc} sobre CPE modificado con distintas cantidades de Fe_3O_4 . Como puede observarse, existe una importante disminución de R_{tc} en función del aumento de la proporción de electrocatalizador en el compósito. Este hecho tiene estrecha relación con la tendencia encontrada en la respuesta amperométrica, indicando que la presencia superficial de mayor cantidad de centros catalíticos proporcione una transferencia de carga facilitada y una mayor sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno a un potencial de trabajo de -0,100 V.

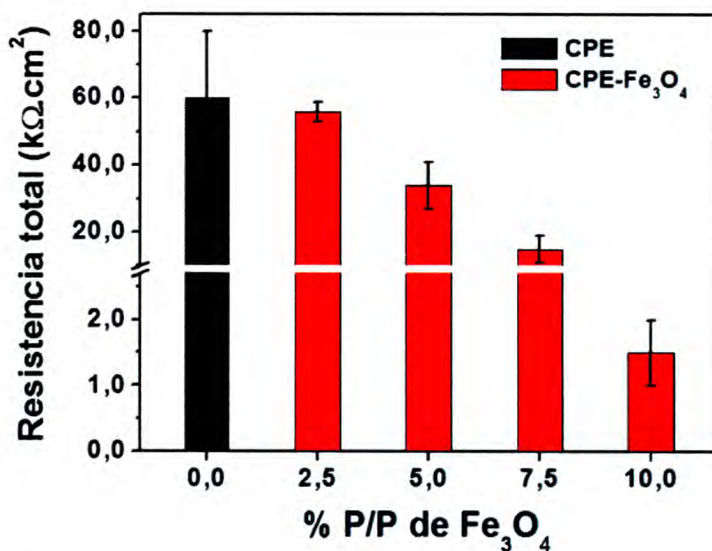


Figura 6. Variación de R_{tc} para la reducción de peróxido de hidrógeno en función de distintas proporciones de Fe_3O_4 en CPE. Otras condiciones como en la **Figura 5**.

3.2.2. Respuesta electroquímica de ácido ascórbico, ácido úrico y paracetamol

En vista de futuras aplicaciones analíticas de $\text{CPE-Fe}_3\text{O}_4$ en el campo de los biosensores, se evaluó el comportamiento electroquímico de diversos analitos como AA, AU y PCTM sobre el compuesto de grafito conteniendo distintas cantidades de Fe_3O_4 . Tal como se discutió en el capítulo I, conocer y analizar comparativamente la respuesta electroquímica de estos analitos es de suma importancia para la aplicación de $\text{CPE-Fe}_3\text{O}_4$ como transductor electroquímico en biosensores que contengan como componente de biorreconocimiento enzimas oxidasas generadoras de peróxido de hidrógeno ya que son interferentes frecuentes en fluidos biológicos.

En la **Figura 7** se muestran las respuestas voltamperométricas de AA, AU y PCTM $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE modificados con distintas cantidades de nanopartículas de Fe_3O_4 (0,0; 2,5; 5,0 y 7,5 % P/P). En las **Tablas 4, 5 y 6** se resumen los parámetros voltamperométricos obtenidos.

Como puede observarse, cuando Fe_3O_4 está presente en el compuesto, existe una disminución de 0,050 V en los sobrepotenciales de oxidación de AA y un ligero aumento de la corriente de dicho proceso (**Figura 7A y Tabla 4**). Para el caso del AU

(Figura 7.B y Tabla 5), la presencia de las nanopartículas de Fe_3O_4 en el compuesto, produce una disminución de 0,150 V en el sobrepotencial de oxidación. El cambio en la corriente de oxidación fue más significativo que en el caso de AA, presentando un incremento del 100 % respecto al electrodo sin modificar.

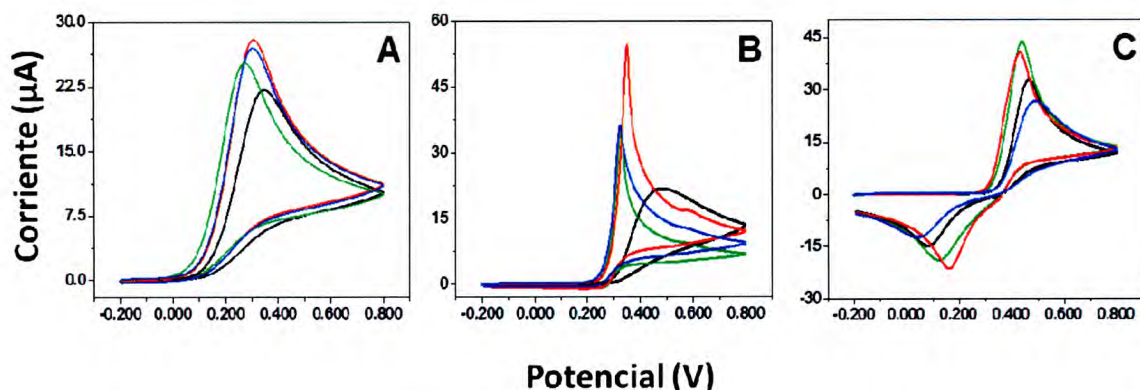


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos para ácido ascórbico (A), ácido úrico (B) y paracetamol (C) $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE conteniendo diferentes cantidades de Fe_3O_4 0,0 (—); 2,5 (—); 5,0 (—) y 7,5 (—) % P/P. Electrolito soporte: “buffer” fosfato 0,050 M pH 7,40. Velocidad de barrido: 0,100 V/s.

Para PCTM (Figura 7.C y Tabla 6), compuesto que presenta un proceso de transferencia de carga cuasirreversible en las condiciones estudiadas, se observa que para las proporciones de 2,5 y 5,0 % P/P, existe una disminución de los sobrepotenciales de oxidación y reducción, además de un aumento significativo en las corrientes asociadas a dichos procesos. Esto último da cuenta de una más eficiente transferencia de carga sobre los electrodos modificados con Fe_3O_4 .

De acuerdo a lo analizado existe efecto catalítico de Fe_3O_4 hacia la electrooxidación de AU y PCTM, siendo menos significativo para la oxidación de AA. Sin embargo, a pesar del efecto electrocatalítico sobre la oxidación de AA, AU y PCTM; a -0,100 V (potencial seleccionado para realizar las determinaciones de peróxido de hidrógeno) no habría interferencia.

Compósito	$E_{p_{ox}}$ (V)	$I_{p_{ox}}$ (μA)
CPE	0,346	22,0
CPE- Fe_3O_4 2,5 %	0,273	25,0
CPE- Fe_3O_4 5,0 %	0,308	27,8
CPE- Fe_3O_4 7,5 %	0,304	26,8

Tabla 4. Parámetros voltamperométricos para AA $1,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos sobre CPE conteniendo 0,0; 2,5; 5,0 y 7,5 % P/P de Fe_3O_4 a partir de los registros mostrados en la **Figura 7A**.

Compósito	$E_{p_{ox}}$ (V)	$I_{p_{ox}}$ (μA)
CPE	0,482	21,8
CPE- Fe_3O_4 2,5 %	0,328	35,9
CPE- Fe_3O_4 5,0 %	0,350	54,3
CPE- Fe_3O_4 7,5 %	0,322	36,0

Tabla 5. Parámetros voltamperométricos para AU $1,0 \times 10^{-3}$ obtenidos sobre CPE conteniendo 0,0; 2,5; 5,0 y 7,5 % P/P de Fe_3O_4 a partir de los registros mostrados en la **Figura 7B**.

Compósito	$E_{p_{ox}}$ (V)	$E_{p_{red}}$ (V)	$I_{p_{ox}}$ (μA)	$I_{p_{red}}$ (μA)	ΔE_p (V)	$I_{p_{ox}}/I_{p_{red}}$
CPE	0,465	0,083	32,6	8,8	0,382	3,7
CPE- Fe_3O_4 2,5 %	0,440	0,123	43,5	8,4	0,317	5,2
CPE- Fe_3O_4 5,0 %	0,433	0,164	40,7	10,2	0,269	4,0
CPE- Fe_3O_4 7,5 %	0,490	0,041	29,4	6,7	0,449	4,4

Tabla 6. Parámetros voltamperométricos para PCTM $1,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos sobre CPE conteniendo 0,0; 2,5; 5,0 y 7,5 % P/P de Fe_3O_4 a partir de los registros mostrados en la **Figura 7C**.

En este sentido se realizaron estudios amperométricos a -0,100 V, con el fin de evaluar la selectividad de CPE modificado con Fe_3O_4 5,0 % P/P en la respuesta a

peróxido de hidrógeno. Se analizó la interferencia de AA y AU $5,0 \times 10^{-3}$ M en la reducción de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M. En ambos casos el porcentaje de interferencia fue nulo demostrando que es posible determinar peróxido de hidrógeno a un potencial de $-0,100$ V sin la interferencia de estos compuestos fácilmente oxidables.

Cabe aclarar que estos valores de concentración de AA y AU analizados son muy superiores a los encontrados, por ejemplo, en muestras reales de suero humano sanguíneo. Para AA, los valores normales son entre $0,5 \times 10^{-5}$ y 10×10^{-5} M en ambos géneros [42] y para AU entre $2,14 \times 10^{-4}$ y $4,58 \times 10^{-4}$ M en hombres y $1,49 \times 10^{-4}$ y $4,04 \times 10^{-4}$ M en mujeres [43].

4. Conclusiones

En este capítulo se presenta un novedoso material de electrodo basado en la dispersión de nanopartículas de Fe_3O_4 electrogeneradas en aceite mineral y grafito. Los resultados obtenidos indican que la presencia de las nanopartículas de Fe_3O_4 en los electrodos compósito de carbono permite una importante mejora en la respuesta electroquímica de peróxido de hidrógeno, principalmente en la reducción, debido a su comportamiento electrocatalítico mediado por el Fe^{+2} presente en las nanopartículas.

La respuesta del electrodo resultante, CPE- Fe_3O_4 , está intrínsecamente relacionada con la proporción del electrocatalizador en el compósito. En este sentido se encontró como óptimo un contenido de 5,0 % P/P de Fe_3O_4 , ya que representa el mejor compromiso entre sensibilidad hacia peróxido de hidrógeno, corriente capacitiva, comportamiento resistivo, tiempo de estabilización de la línea de base y maleabilidad del compósito para obtener superficies reproducibles.

La presencia de las nanopartículas, en la proporción seleccionada, permite la detección de peróxido de hidrógeno a bajos sobrepotenciales, sin la interferencia, aún en gran exceso, de compuestos fácilmente oxidables como AA, AU y PCTM.

De esta manera, las atractivas propiedades de este nuevo material, abren las puertas a aplicaciones analíticas promisorias basadas en el uso de dicho compuesto como transductor electroquímico y como plataforma de inmovilización de enzimas oxidasas generadoras de peróxido de hidrogeno.

5. Bibliografía

- [1] R. N. Adams, "Carbon Paste Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 30, Nro. 9, pp. 1576–1576, 1958.
- [2] I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, "Carbon paste electrodes in the new millennium," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 7, Nro. 4, pp. 598–656, 2009.
- [3] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 2, pp. 814–825, 2008.
- [4] O. A. Sadik, A. O. Aluoch, A. Zhou, "Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, Nro. 9, pp. 2749–2765, 2009.
- [5] E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, "Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice," *Sensors*, vol. 10, Nro. 5, pp. 4558–4576, 2010.
- [6] A. Heller, B. Feldman, "Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 7, pp. 2482–2505, 2008.
- [7] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, "Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 57, Nro. 1–3, pp. 268–273, 1999.
- [8] A. A. Karyakin, E. A. Paganova, I. A. Budashov, I. N. Kurochkin, E. E. Karyakina, V. A. Levchenko, V. N. Matveyenko, S. D. Varfolomeyev, "Prussian blue based nanoelectrode arrays for H_2O_2 detection," *Anal. Chem.*, vol. 76, Nro. 2, pp. 474–478, 2004.
- [9] M. Somasundrum, K. Kirtikara, M. Tanticharoen, "Amperometric determination of hydrogen peroxide by direct and catalytic reduction at a copper electrode," *Anal. Chim. Acta*, vol. 319, Nro. 1–2, pp. 59–70, 1996.
- [10] H. A. Sakslund, J. A. Wang, O. Hammerich, "Prussian Blue Based Nanoelectrode-Arrays for H_2O_2 detection," *Anal. Chem.*, vol. 402, Nro. 1–2, pp. 149–160, 2004.
- [11] J. Wang, J. Llu, L. Chen, F. Lu, "Highly Selective Membrane-Free, Mediator-Free Glucose Biosensor," *Anal. Chem.*, vol. 66, Nro. 21, pp. 3600–3603, 1994.

- [12] J. Wang, G. Rivas, M. Chicharro, "Iridium Dispersed Carbon Paste Enzyme Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 8, Nro. 5, pp. 434–437, 1996.
- [13] M. S. Celej, G. Rivas, "Amperometric Glucose Biosensor Based on Gold-Dispersed Carbon Paste," *Electroanalysis*, vol. 10, Nro. 11, pp. 771–775, 1998.
- [14] M. C. Rodríguez, G. A. Rivas, "Highly Selective First Generation Glucose Biosensor Based on Carbon Paste Containing Copper and Glucose Oxidase," *Electroanalysis*, vol. 13, Nro. 14, pp. 1179–1184, 2001.
- [15] J. Liu, F. Lu, J. Wang, "Metal-alloy-dispersed carbon-paste enzyme electrodes for amperometric biosensing of glucose," *Electrochem. commun.*, vol. 1, Nro. 8, pp. 341–344, 1999.
- [16] M. C. Rodríguez, G. A. Rivas, "An enzymatic glucose biosensor based on the codeposition of rhodium, iridium, glucose oxidase onto a glassy carbon transducer," *Anal. Lett.*, vol. 34, Nro. 11, pp. 1829–1840, 2001.
- [17] S. A. Miscoria, G. D. Barrera, G. A. Rivas, "Analytical Performance of a Glucose Biosensor Prepared by Immobilization of Glucose Oxidase and Different Metals into a Carbon Paste Electrode," *Electroanalysis*, vol. 14, Nro. 14, p. 981, 2002.
- [18] S. A. Miscoria, G. D. Barrera, G. A. Rivas, "Enzymatic Biosensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified with Gold Nanoparticles and Polyphenol Oxidase," *Electroanalysis*, vol. 17, Nro. 17, pp. 1578–1582, 2005.
- [19] S. A. Miscoria, G. D. Barrera, G. A. Rivas, "Glucose biosensors based on the immobilization of glucose oxidase and polytyramine on rodhized glassy carbon and screen printed electrodes," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 115, Nro. 1, pp. 205–211, 2006.
- [20] G. L. Luque, M. C. Rodríguez, G. A. Rivas, "Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix," *Talanta*, vol. 66, Nro. 2, pp. 467–471, 2005.
- [21] L. Zhang, H. Li, Y. Ni, J. Li, K. Liao, G. Zhao, "Porous cuprous oxide microcubes for non-enzymatic amperometric hydrogen peroxide and glucose sensing," *Electrochem. commun.*, vol. 11, Nro. 4, pp. 812–815, 2009.
- [22] N. W. Beyene, P. Kotzian, K. Schachl, H. Alemu, H. Moderegger, I. Švancara, K. Vytras, K. Kalcher, "(Bio) sensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections , further improvements and applications," *Talanta*, vol. 64, pp. 1151–1159, 2004.
- [23] E. Turkusic, J. Kalcher, E. Kahrovic, N. W. Beyene, H. Moderegger, E. Sofic, S. Begic, K. Kalcher, "Amperometric determination of bonded glucose with an MnO_2 and glucose oxidase bulk-modified screen-printed electrode using flow-injection analysis.," *Talanta*, vol. 65, Nro. 2, pp. 559–564, 2005.

- [24] G. L. Luque, N. F. Ferreyra, A. G. Leyva, G. A. Rivas, "Characterization of carbon paste electrodes modified with manganese based perovskites-type oxides from the amperometric determination of hydrogen peroxide," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 142, Nro. 1, pp. 331–336, 2009.
- [25] J.-M. You, D. Kim, S. K. Kim, M.-S. Kim, H. S. Han, S. Jeon, "Novel determination of hydrogen peroxide by electrochemically reduced graphene oxide grafted with aminothiophenol–Pd nanoparticles," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 178, pp. 450–457, 2013.
- [26] X. Niu, H. Zhao, C. Chen, M. Lan, "Platinum nanoparticle-decorated carbon nanotube clusters on screen-printed gold nanofilm electrode for enhanced electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide," *Electrochim. Acta*, vol. 65, pp. 97–103, 2012.
- [27] Y. Li, F. Huang, Z. Luo, B. Xu, X. Wang, F. Li, F. Wang, L. Huang, S. Li, Y. Li, "A new hydrogen peroxide biosensor based on synergy of Au@Au₂S₂O₃ core–shell nanomaterials and multi-walled carbon nanotubes towards hemoglobin," *Electrochim. Acta*, vol. 74, pp. 280–286, 2012.
- [28] F. Xi, D. Zhao, X. Wang, P. Chen, "Non-enzymatic detection of hydrogen peroxide using a functionalized three-dimensional graphene electrode," *Electrochem. commun.*, vol. 26, pp. 81–84, 2013.
- [29] S. Palanisamy, S. Cheemalapati, S.-M. Chen, "Highly sensitive and selective hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized at multiwalled carbon nanotubes-zinc oxide composite electrode," *Anal. Biochem.*, vol. 429, Nro. 2, pp. 108–115, 2012.
- [30] G. Nie, X. Lu, J. Lei, L. Yang, X. Bian, Y. Tong, C. Wang, "Sacrificial template assisted fabrication of palladium hollow," *Electrochim. Acta*, vol. 99, pp. 145–151, 2013.
- [31] S. Qu, J. Wang, J. Kong, P. Yang, G. Chen, "Magnetic loading of carbon nanotube/nano-Fe₃O₄ composite for electrochemical sensing," *Talanta*, vol. 71, Nro. 3, pp. 1096–1102, 2007.
- [32] J. Chumming, L. Xiangqin, "Electrochemical synthesis of Fe₃O₄-PB nanoparticles with core-shell structure and its electrocatalytic reduction toward H₂O₂," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 13, Nro. 8, pp. 1273–1278, 2009.
- [33] M. S. Lin, H. J. Leu, "A Fe₃O₄-based chemical sensor for cathodic determination of hydrogen peroxide," *Electroanalysis*, vol. 17, Nro. 21, pp. 2068–2073, 2005.
- [34] G. Bencsik, C. Janáky, B. Endrődi, C. Visy, "Electrocatalytic properties of the polypyrrole/magnetite hybrid modified electrode towards the reduction of hydrogen peroxide in the presence of dissolved oxygen," *Electrochim. Acta*, vol. 73, pp. 53–58, 2012.
- [35] L. Zhang, Y. Zhai, N. Gao, D. Wen, S. Dong, "Sensing H₂O₂ with layer-by-layer assembled Fe₃O₄-PDDA nanocomposite film," *Electrochem. commun.*, vol. 10, Nro. 10, pp. 1524–1526, 2008.

- [36] B. Xuexia Liu, "An amperometric hydrogen peroxide chemical sensor based on graphene- Fe_3O_4 multilayer films modified ITO electrode," *Talanta*, vol. 87, pp. 243–248, 2011.
- [37] Y. He, Q. Sheng, J. Zheng, M. Wang, B. Liu, "Magnetite–graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing application," *Electrochim. Acta*, vol. 56, Nro. 5, pp. 2471–2476, 2011.
- [38] J. Hrbac, V. Halouzka, R. Zboril, K. Papadopoulos, T. Triantis, "Carbon electrodes modified by nanoscopic iron(III) oxides to assemble chemical sensors for the hydrogen peroxide amperometric detection," *Electroanalysis*, vol. 19, Nro. 17, pp. 1850–1854, 2007.
- [39] M.-P. Pileni, "Magnetic fluids: Fabrication, magnetic properties, organization of nanocrystals," *Adv. Funtional Mater.*, vol. 11, Nro. 5, pp. 323–336, 2001.
- [40] R. J. Harrison, A. Putnis, "Magnetic properties of the magnetite-spinel solid solution: Saturation magnetization and cation distributions," *Am. Mineral.*, vol. 80, pp. 213–221, 1995.
- [41] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M. P. Morales, P. Herrasti, "Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization," *Electrochim. Acta*, vol. 53, Nro. 8, pp. 3436–3441, 2008.
- [42] S. C. Rumsey, M. Levine, "Review Absorption , transport , disposition of ascorbic acid in humans," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 2863, Nro. 98, pp. 116–130, 1998.
- [43] L. Kaplan, *Química Clínica. Teoría, análisis y correlación. Técnicas de laboratorio - Fisiopatología - Métodos de análisis*, 5th ed. Ohio, Estados Unidos: Panamericana S.A., 1991, p. 1497.

*“No vivas para que tu presencia se note,
sino para que tu ausencia se sienta”.*

Bob Marley.

Capítulo IV

***Incorporación de proteínas a
compósitos de grafito conteniendo
nanopartículas de Fe_3O_4***

1. Introducción

El peróxido de hidrógeno es un compuesto ampliamente utilizado en alimentos, como así también en la industria farmacéutica y química [1, 2]. Las aplicaciones más importantes están basadas en su poder oxidante y desinfectante. En los sistemas biológicos, es un importante metabolito obtenido como subproducto de numerosas reacciones enzimáticas [3, 4].

Se han propuesto técnicas espectroscópicas [5–19] y electroquímicas [9–19] para la cuantificación del peróxido de hidrógeno. Los métodos electroquímicos han recibido considerable atención debido a su relativo bajo costo, simplicidad, portabilidad y sensibilidad. En este sentido, y como se mencionó en el capítulo III, es importante desarrollar estrategias con el objeto de disminuir los elevados sobrepotenciales de oxidación y reducción del peróxido de hidrógeno para asegurar una determinación sensible y selectiva de dicho analito. Se ha propuesto el uso de nanopartículas metálicas [20, 21], óxidos metálicos [16], polímeros [11, 17, 22], enzimas [5, 9–12], nanotubos de carbono [23] y más recientemente el grafeno [19] entre otros nanomateriales [14, 15, 18, 27].

La peroxidasa de rábano, citocromo C, hemoglobina y mioglobina han sido alternativas ampliamente utilizadas para la construcción de biosensores amperométricos de peróxido de hidrógeno, debido predominantemente a su alta selectividad [9–14]. Sin embargo, la estabilidad y respuesta de los sensores obtenidos se encuentran limitadas, principalmente, por la pérdida de actividad biocatalítica del componente de reconocimiento inmovilizado. A esta última desventaja se le agregan los protocolos de inmovilización de las biomoléculas poco económicos y complejos. De este modo, los electrodos compósitos de carbono surgen como una alternativa promisorio por su fácil preparación, versatilidad y posibilidad de inmovilizar (nano)partículas, biomoléculas, tejidos y mediadores [25]. En este sentido, en el capítulo anterior se describió la modificación de los electrodos compósito de carbono con nanopartículas de Fe_3O_4 electrogeneradas y la ventaja que producen en la reducción de peróxido de hidrógeno debido a su comportamiento catalítico preferencial.

En este capítulo se discute el efecto de la incorporación de diferentes proteínas a compósitos de grafito modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 electrogeneradas, en la respuesta electroquímica de peróxido de hidrógeno. Se analiza y discute aspectos relacionados con la influencia de la cantidad de biomolécula y nanomaterial, la naturaleza proteica y la incidencia del tipo de surfactante utilizado en la electrosíntesis de las nanopartículas en el comportamiento electroquímico de los electrodos resultantes.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Glucosa oxidasa (GOx), albúmina (Alb), insulina (Ins), ovolisozima (Lis), mucina (Muc), caseína (Cas) y quitosano fueron obtenidas en Sigma. El cloruro de tetrametil amonio y bromuro de hexadeciltrimetil amonio fueron adquiridos en Merck. Todos los reactivos fueron de grado analítico y no se utilizaron purificaciones adicionales. Para la preparación de soluciones se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18\text{M}\Omega\text{cm}$) obtenida de un sistema Millipore-MilliQ. Como electrolito soporte se utilizó "buffer" fosfato 0,050M pH 7,40.

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) fueron electrosintetizadas como se describió en el capítulo II.

2.2. Instrumental

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato TEQ_02. Como electrodo de trabajo se utilizaron CPEs modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 y/o proteína, empaquetados firmemente en una cavidad de Teflón de 3,0 mm de diámetro.

2.3. Preparación del electrodo de trabajo

Como se describió en el capítulo II, los electrodos compósito de grafito sin modificar (CPE) y modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 y/o proteína (CPE- Fe_3O_4 -Prot) fueron preparados de manera similar mezclando el polvo de grafito (Fisher grade N° 38) con aceite mineral. Los compósitos conteniendo proteína fueron almacenados a 4 °C, mientras que el resto se mantuvo a temperatura ambiente. Las medidas amperométricas fueron realizadas en condiciones de convección forzada utilizando un agitador magnético, en “buffer” fosfato 0,050 M pH 7,40, aplicando un potencial de trabajo de -0,100 V y esperando hasta que la corriente alcance el estado estacionario previo a la adición del analito en la celda electroquímica. Las medidas por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) fueron realizadas en un rango de frecuencias desde 10 KHz hasta 10 mHz, aplicando una perturbación de 0,010 V y un potencial de trabajo de -0,100 V usando como marcador rédox peróxido de hidrógeno $2,5 \times 10^{-2}$ M. Los espectros de impedancia fueron analizados y procesados usando el programa Z-view. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

3. Resultados y discusión

3.1. Respuesta voltamperométrica de peróxido de hidrógeno sobre CPE- Fe_3O_4 modificado con albúmina

Como se mencionó anteriormente, se requieren elevados sobrepotenciales para oxidar o reducir el peróxido de hidrógeno sobre electrodos de carbono. En este sentido, en el capítulo III se demostró el efecto electrocatalítico de las nanopartículas de Fe_3O_4 electrosintetizadas al incorporarlas al compósito de carbono debido a la significativa disminución de los sobrepotenciales de reducción de dicho marcador.

La **Figura 1** muestra los voltamperogramas cíclicos para peróxido de hidrógeno 0,500 M obtenidos sobre CPE, CPE modificado con Fe_3O_4 (5,0 % P/P) (CPE- Fe_3O_4) y CPE

modificado con Fe_3O_4 (5,0 % P/P) y Alb (5,0 % P/P) (CPE- Fe_3O_4 -Alb). En el gráfico insertado de la **Figura 1** se muestra la respuesta obtenida sobre CPE y CPE- Fe_3O_4 .

Como puede observarse, la oxidación de peróxido de hidrógeno sobre CPE- Fe_3O_4 -Alb comienza aproximadamente a 0,3 V, mientras que la reducción comienza a 0,1 V. Se evidencia que la presencia de Alb no produce cambios significativos en los sobrepotenciales de oxidación o de reducción del marcador cuando CPE- Fe_3O_4 es modificado con la proteína. Sin embargo se observa un notable incremento de las corrientes asociadas para ambos procesos. Por otra parte, cabe aclarar que la presencia de proteína en el compósito aumenta la proporción de material no conductor a expensas del material conductor (grafito), incrementando significativamente por este motivo la corriente capacitiva. Voltamperogramas obtenidos sobre CPE sólo modificado con Alb (5,0 % P/P) (CPE-Alb) demostraron que tanto en el proceso oxidativo como el reductivo la corrientes asociadas son superiores que las obtenidas con CPE (resultados no mostrados).

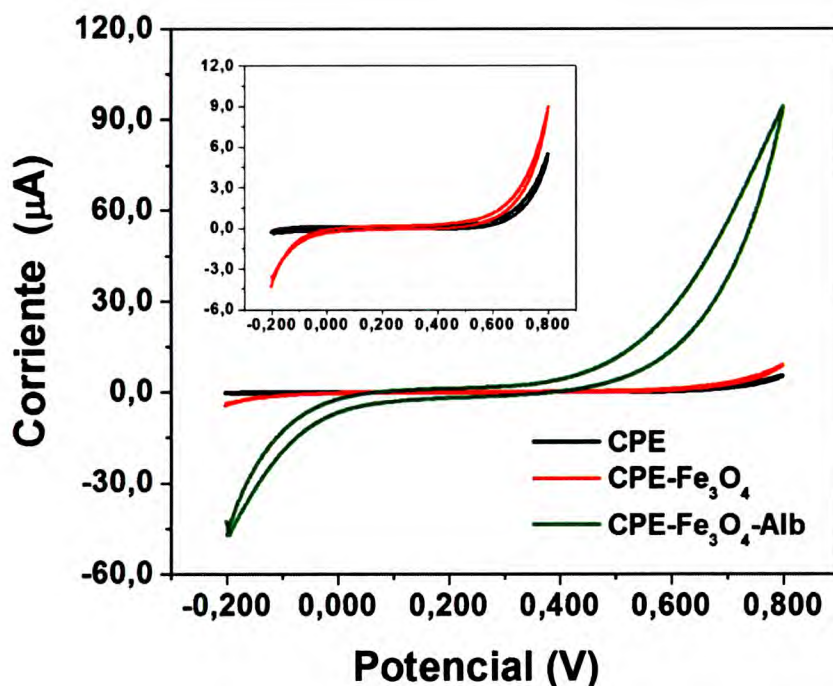


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos para peróxido de hidrógeno 0,500 M sobre: compósito de carbono (CPE); CPE conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4); 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de albúmina (CPE- Fe_3O_4 -Alb). En el grafico insertado se muestra en escala ampliada los voltamperogramas para CPE y CPE- Fe_3O_4 . Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40. Velocidad de barrido 0,100 V/s.

En la **Tabla 1** se presentan los valores de corriente obtenidos a -0,100 y +0,700 V para los diferentes compósitos a partir de los experimentos de voltamperometría cíclica de la **Figura 1** y la relación de éstos con respecto a CPE.

La notable mejora en la respuesta electrocatalítica hacia la óxido-reducción de peróxido de hidrógeno obtenida con la incorporación de Fe₃O₄ en el compósito se hace aún más marcada en presencia de la proteína. Se produce un importante aumento de las corrientes de reducción y de oxidación del peróxido de hidrógeno al modificar CPE-Fe₃O₄ con 5,0 % P/P de Alb, siendo incrementadas en un factor de 17,7 y 18,1 respectivamente.

A su vez, en comparación con CPE, CPE-Alb responde con un incremento en la corriente de 1,9 y 2,6 veces para la oxidación y reducción respectivamente. Estos resultados demuestran que la incorporación de la biomolécula en el compósito promueve un significativo cambio en la matriz electródica. Sin embargo no da cuenta del gran incremento de corriente observada en CPE-Fe₃O₄-Alb de donde se desprende que la mejora observada está relacionada a una asociación sinérgica entre la nanopartícula y la proteína.

Compósito	$I_{(-0,100\text{ V})}$ (μA)	$I_{(0,700\text{ V})}$ (μA)	$\frac{I_{(-0,100\text{ V})} \text{ CPE-Fe}_3\text{O}_4 \text{ y/o Alb}}{I_{(-0,100\text{ V})} \text{ CPE}}$	$\frac{I_{(0,700\text{ V})} \text{ CPE-Fe}_3\text{O}_4 \text{ y/o Alb}}{I_{(0,700\text{ V})} \text{ CPE}}$
CPE	-0,077	1,673	-----	-----
CPE-Fe ₃ O ₄	-0,920	2,882	11,9	1,7
CPE-Alb	-0,202	3,140	2,6	1,9
CPE-Fe ₃ O ₄ -Alb	-16,25	51,6	211,0	30,8

Tabla 1. Corrientes obtenidas a -0,100 y +0,700 V para peróxido de hidrógeno 0,500 M sobre compósitos de carbono (CPE); CPE conteniendo 5,0 % P/P de Fe₃O₄ (CPE-Fe₃O₄); 5,0 % P/P de albúmina (CPE-Alb); 5,0 % P/P de Fe₃O₄ y 5,0 % P/P de Alb (CPE-Fe₃O₄-Alb).

3.2. Efecto de la relación Fe_3O_4 /Albúmina en la respuesta amperométrica a peróxido de hidrógeno

En la **Figura 2** se muestra en forma comparativa la respuesta amperométrica obtenida sobre CPE, CPE- Fe_3O_4 y CPE- Fe_3O_4 -Alb a partir de experimentos realizados a $-0,100\text{ V}$ para adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}\text{ M}$. En el gráfico insertado se muestran los registros amperométricos ampliados para CPE y CPE- Fe_3O_4 . En la **Tabla 2**, se presentan las sensibilidades obtenidas a partir de las curvas de calibración de los registros amperométricos para las distintas plataformas estudiadas.

Tal como se observa en la **Figura 2** y en concordancia con los resultados obtenidos en los voltamperogramas cíclicos mostrados anteriormente, la corriente proveniente de la actividad electrocatalítica de las nanopartículas de Fe_3O_4 hacia la reducción del marcador incrementa significativamente cuando se incorpora albúmina al compuesto. La sensibilidad del electrodo conteniendo Fe_3O_4 y Alb es 230 veces superior a la obtenida con CPE y 38,3 veces respecto a la de CPE- Fe_3O_4 .

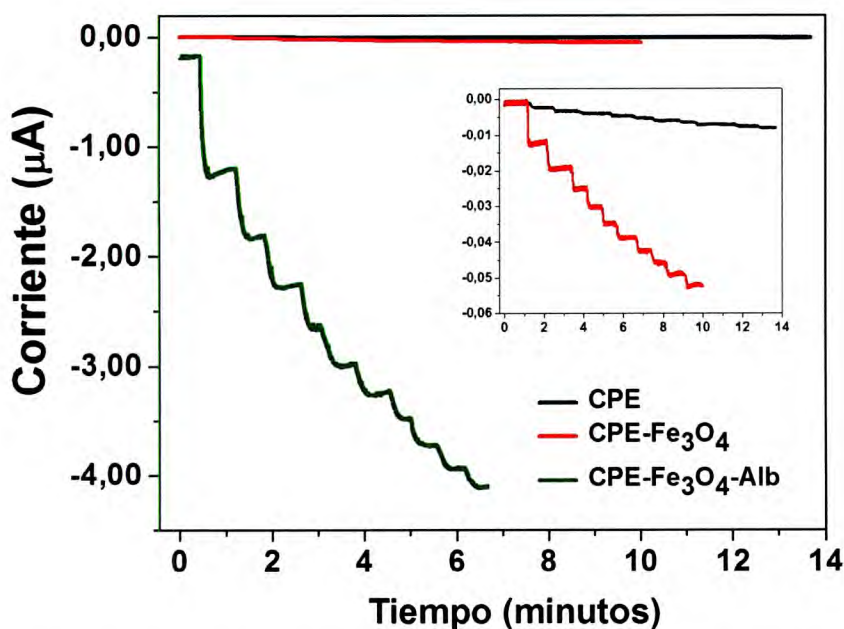


Figura 2. Registros amperométricos obtenidos para agregados sucesivos de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}\text{ M}$ realizados a $-0,100\text{ V}$ sobre diferentes compósitos de carbono (CPE); CPE conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4); 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de albúmina (CPE- Fe_3O_4 -Alb). Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40.

Compósito	Sensibilidad ($\mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$)
CPE	(0,50 \pm 0,03)
CPE-Fe ₃ O ₄	(3,0 \pm 0,3)
CPE-Alb	(0,75 \pm 0,05)
CPE-Fe ₃ O ₄ -Alb	(115 \pm 7)

Tabla 2. Valores de sensibilidad obtenidos a partir de registros amperométricos como los mostrados en la **Figura 2**.

Rivas y Miscoria demostraron este efecto al dispersar nanopartículas de oro en compósitos de grafito, observando que la respuesta electrocatalítica hacia la oxido-reducción del peróxido de hidrógeno mejora sustancialmente cuando se incorpora una proteína al compósito [21]. Los autores atribuyen esta mejora en la respuesta electroquímica a una dispersión facilitada de las nanopartículas en el compósito de grafito en presencia de la proteína. En este aspecto, numerosos son los autores que reportan la adsorción espontánea de Alb sobre las más diversas superficies nanoestructuradas y la consecuente formación de una corona biomolecular [26–33]. La incorporación de las moléculas de proteínas sobre la superficie de Fe₃O₄ propiciaría una más facilitada dispersión del nanomaterial dentro del compósito de grafito.

Por otro lado, tal como se observa en la **Tabla 2**, la incorporación de Alb a CPE, presenta una mejora del 50 % en la sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno. Este hallazgo confirmaría lo propuesto a partir de los resultados voltamperométricos, en los que se plantea el hecho de que a pesar de un aumento de proporción del material no conductor en el compósito, la presencia de proteína incrementaría la respuesta electroquímica debido a una mejor distribución del grafito en el mismo.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la cantidad de nanopartículas de Fe₃O₄ incorporadas en CPE (desde 0,0 hasta 10,0 % P/P) en presencia de Alb 5,0 % P/P, se realizaron experimentos amperométricos sobre los distintos electrodos. En la **Figura 3** se muestra la variación de la sensibilidad de las curvas de calibración obtenidas a partir de los registros amperométricos a -0,100 V para adiciones sucesivas

de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M, en función de la proporción de Fe_3O_4 en el compósito.

En la **Figura 3** se puede observar que cuando se modifica CPE con 5,0 % P/P de Alb y cantidades crecientes de Fe_3O_4 , la sensibilidad a peróxido de hidrógeno aumenta considerablemente estableciéndose una diferencia significativa con la respuesta obtenida para CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P. Por ejemplo, al incorporar 5,0 % P/P de Alb en CPE conteniendo 5,0 P/P de nanopartículas la sensibilidad del sensor incrementa 38,3 veces en comparación con el compósito conteniendo únicamente el nanomaterial.

A partir de los resultados obtenidos, se escogió 5,0 % P/P de Fe_3O_4 como proporción óptima para la modificación de CPE, ya que permitió lograr el mejor compromiso entre sensibilidad y cantidad de electrocatalizador. A continuación se estudió el efecto de Alb sobre CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P.

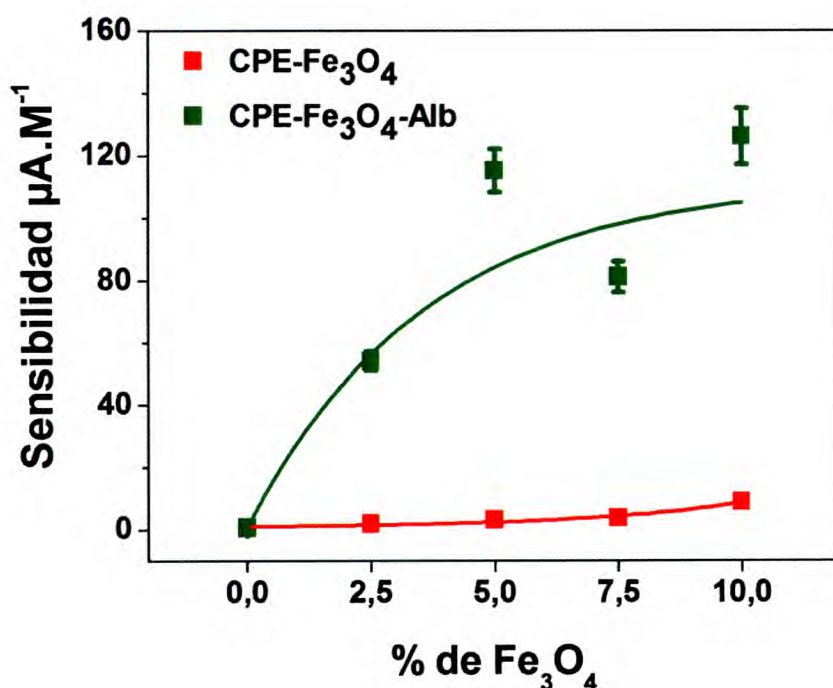


Figura 3. Efecto de la proporción de Fe_3O_4 en CPE en la sensibilidad para peróxido de hidrógeno en ausencia y presencia de albúmina. Otras condiciones como en la **Figura 2**.

Otra variable analizada fue la proporción de Alb presente en CPE conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 frente a la reducción del peróxido de hidrógeno. La **Figura 4** muestra la relación entre la sensibilidad de las curvas de calibración obtenidas a partir

de los registros amperométricos a $-0,100$ V para adiciones de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M, en función de la proporción de Alb en el compósito.

Como puede observarse en la **Figura 4**, a medida que aumenta la proporción de proteína en el compósito, hasta llegar al 10,0 % P/P, la sensibilidad incrementa linealmente ($r^2 = 0,991$). Esto demuestra que no sólo la presencia de proteína es importante, sino que también lo es la proporción de la misma, ya que mayores cantidades de la biomolécula propiciarían una mejor dispersión de las nanopartículas en los compósitos de carbono.

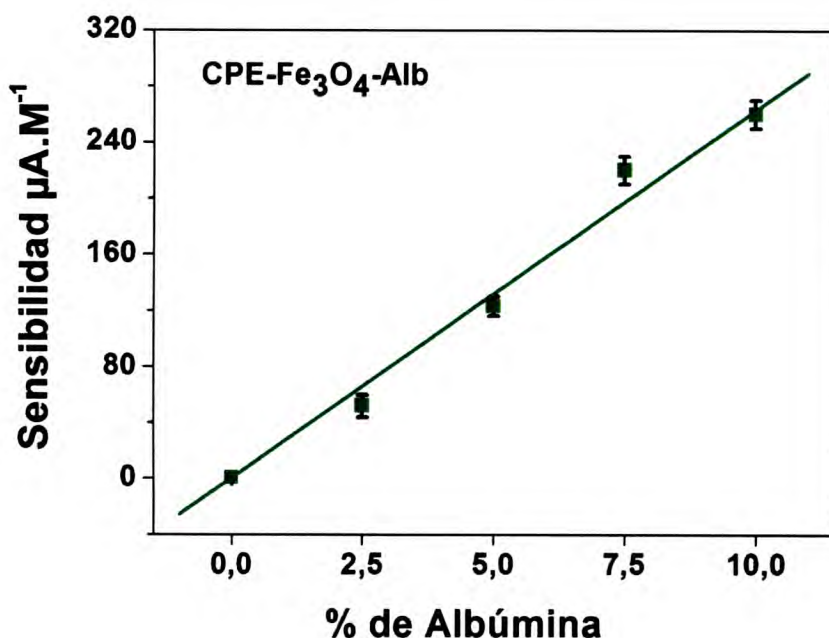


Figura 4. Efecto de la proporción de albúmina en CPE-Fe₃O₄ en la sensibilidad obtenida hacia peróxido de hidrógeno. Otras condiciones como en la **Figura 2**.

En la **Tabla 3** se muestran los parámetros analíticos calculados a partir de dichas curvas de calibración junto a las obtenidas sobre CPE conteniendo únicamente 5,0 y 10,0 % P/P de Alb.

Compósito	Sensibilidad ($\mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$)	Límite de detección (mM)	Intervalo lineal hasta (mM)	Coefficiente de correlación (r^2)	Repetitividad intersuperficie
CPE-Alb 5,0 %	$0,75 \pm 0,05$	0,528	12	0,993	8,8 %
CPE-Alb 10,0 %	$2,8 \pm 0,6$	0,077	10	0,992	33,8%
CPE- Fe_3O_4 -Alb 2,5 %	51 ± 3	0,037	12	0,991	19,1 %
CPE- Fe_3O_4 -Alb 5,0 %	115 ± 7	0,021	14	0,991	7,2 %
CPE- Fe_3O_4 -Alb 7,5 %	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^2$	0,023	12	0,993	4,9 %
CPE- Fe_3O_4 -Alb 10 %	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^2$	0,011	12	0,996	4,2 %

Tabla 3. Parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para peróxido de hidrógeno sobre CPE, y CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P modificado con distintas proporciones de Alb. Otras condiciones como en la **Figura 2**.

3.3. Efecto de la relación Fe_3O_4 /albúmina en la respuesta impedimétrica a peróxido de hidrógeno

A fin de determinar las propiedades eléctricas de CPE modificado con nanopartículas de Fe_3O_4 y Alb, se llevaron a cabo mediciones de EIE. En esta sección se analiza el comportamiento electroquímico de CPE, CPE- Fe_3O_4 y CPE- Fe_3O_4 -Alb en una solución de peróxido de hidrógeno $2,5 \times 10^{-2}$ M entre 10 KHz y 10 mHz, a un potencial de trabajo de -0,100 V y una perturbación de 0,010 V. En la **Figura 5** se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos sobre las plataformas CPE, CPE- Fe_3O_4 y CPE- Fe_3O_4 -Alb.

Del mismo modo que para explicar el espectro de impedancia para la reducción del peróxido de hidrógeno sobre CPE- Fe_3O_4 fue necesario utilizar un circuito equivalente con una R_{tc} y una C_{dc} respecto de $R_s(R_{tc}C_{dc})$. En el caso de CPE- Fe_3O_4 -Alb también se usó dicho circuito.

En la **Figura 5** se muestra que la presencia de Alb 5,0 % P/P en CPE- Fe_3O_4 facilita la transferencia electrónica debido a que el semicírculo correspondiente a R_{tc} que presenta CPE- Fe_3O_4 -Alb es significativamente menor que el obtenido sobre CPE conteniendo únicamente Fe_3O_4 . En la **Tabla 4** se comparan las R_{tc} encontradas a partir

del ajuste de los datos experimentales para las distintas plataformas. El hallazgo más importante es la disminución de R_{tc} en un factor de 18,9 al incorporar Alb en el compósito conteniendo Fe_3O_4 respecto el valor obtenido con CPE- Fe_3O_4 . Estos resultados son consistentes con los encontrados en los experimentos empleando voltamperometría cíclica y amperometría.

El notable incremento en la reactividad de CPE- Fe_3O_4 -Alb hacia la reducción del peróxido de hidrógeno respecto a CPE- Fe_3O_4 se explica a partir de una facilitada transferencia electrónica dado por una más eficiente dispersión del nanomaterial electrocatalítico en el compósito debido a su asociación con la biomolécula.

Cuando se modifica CPE sólo con Alb, la R_{tc} disminuye respecto de CPE debido a que la presencia de la biomolécula mejoraría sustancialmente la distribución del material responsable de la conducción electrónica en el compósito (no mostrado).

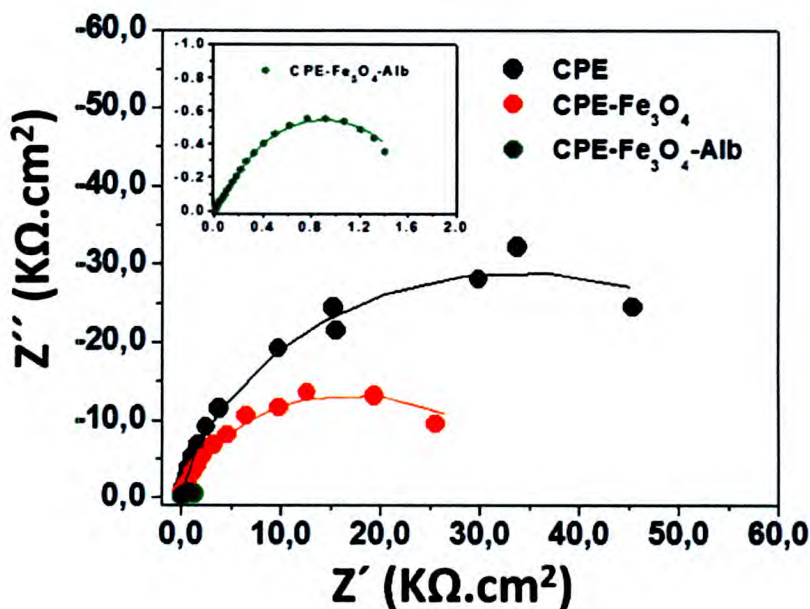


Figura 5. Diagramas de Nyquist para la respuesta de peróxido de hidrógeno $2,5 \times 10^{-2}M$ obtenidos a partir de espectros de impedancia electroquímica sobre diferentes compósitos de pasta de grafito, (CPE); conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4); 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de albúmina (CPE- Fe_3O_4 -Alb). Condiciones experimentales: E: -0,100 V. Intervalo de frecuencia: $1,0 \times 10^{-2}Hz$ a $1,0 \times 10^4Hz$. Amplitud: 0,010 V.

Compósito	R_{tc} ($K\Omega.cm^2$)
CPE	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^2$
CPE-Fe₃O₄	$(0,34 \pm 0,07) \times 10^2$
CPE-Fe₃O₄-Alb	$(0,018 \pm 0,004) \times 10^2$

Tabla 4. Valores de R_{tc} obtenidos de los diagramas de Nyquist como los de de la **Figura 5**.

Para explicar el aumento de la reactividad observado frente a la presencia de la proteína en el compósito, se estudió la variación de R_{tc} en función de la proporción de Fe₃O₄ incorporada en CPE-Alb 5,0 % P/P. La **Figura 6** muestra los valores de R_{tc} obtenidos para CPE (barras rojas) y CPE-Alb 5,0 % P/P (barras verdes) modificadas con distintas proporciones de Fe₃O₄.

En el capítulo II se demostró que R_{tc} disminuye frente al aumento de la cantidad de Fe₃O₄ incorporada en CPE debido a una mayor cantidad de centros electrocatalíticos para la oxido-reducción de peróxido de hidrógeno. Como puede observarse en la **Figura 6**, en presencia de 5,0 % P/P Alb se presenta la misma tendencia de disminución de R_{tc} en función del aumento de la cantidad de nanopartículas en el compósito, lo que indica una transferencia de carga facilitada respecto a los compósitos conteniendo únicamente Fe₃O₄ en su matriz. Nótese, por ejemplo, que la presencia de 5,0 % P/P de Alb en CPE-Fe₃O₄ 2,5 y 7,5 % P/P genera una disminución de R_{tc} en un factor de 25,4 y 11,5 respectivamente en comparación con al compósito que contiene solo el electrocatalizador. Al ser incorporada Alb en CPE-Fe₃O₄ 10,0 % P/P, no se observó una disminución de R_{tc} del mismo orden de magnitud que en los electrodos conteniendo menos proporción de Fe₃O₄. Esto indica que la cantidad de proteína no es suficiente para lograr la dispersión de las nanopartículas.

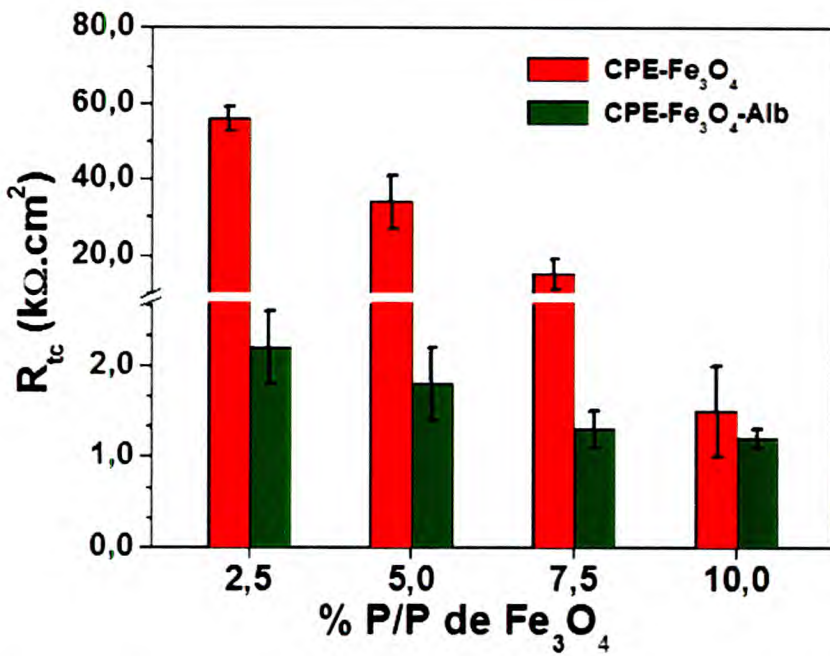


Figura 6. Variación de R_{tc} en función de distintas proporciones de Fe_3O_4 en CPE y CPE-Alb 5,0 % P/P para peróxido de hidrógeno. Otras condiciones como en la **Figura 5**.

Con el propósito de efectuar un análisis comparativo entre el aumento de la sensibilidad y la disminución de la R_{tc} con la incorporación de Alb 5,0 % P/P en CPE- Fe_3O_4 , se define un factor dispersivo (**Fd**) para ambos parámetros. Para el caso de la sensibilidad, indicando el número de veces que ésta incrementa, dado por:

$$Fd_s = \frac{S_{CPE-Fe_3O_4-Alb\ 5,0\ \% P/P}}{S_{CPE-Fe_3O_4}} \quad \text{Ecuación I}$$

y para R_{tc} , mostrando la cantidad de veces que la misma disminuye en presencia de dicha proporción de proteína:

$$Fd_{R_{tc}} = \frac{R_{tc\ CPE-Fe_3O_4}}{R_{tc\ CPE-Fe_3O_4-Alb\ 5,0\ \% P/P}} \quad \text{Ecuación II}$$

En la **Figura 7** se muestra la variación de Fd_S y $Fd_{R_{tc}}$ en función de la cantidad de nanopartículas al incorporar Alb 5,0 % P/P en el electrodo compuesto.

De acuerdo a la tendencia mostrada en la **Figura 7**, es posible afirmar que el considerable aumento de sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno como producto del efecto dispersivo sobre Fe_3O_4 que se produce al incorporar Alb en el compuesto, es acompañado por una disminución de R_{tc} del mismo orden de magnitud. Se observa para ambos parámetros una consistente disminución del factor dispersivo a medida que la cantidad de nanopartículas aumenta en el compuesto. Esto está indicando, que la capacidad dispersiva de 5,0 % P/P de Alb en CPE- Fe_3O_4 presenta un límite con el incremento de la cantidad de electrocatalizador en el compuesto.

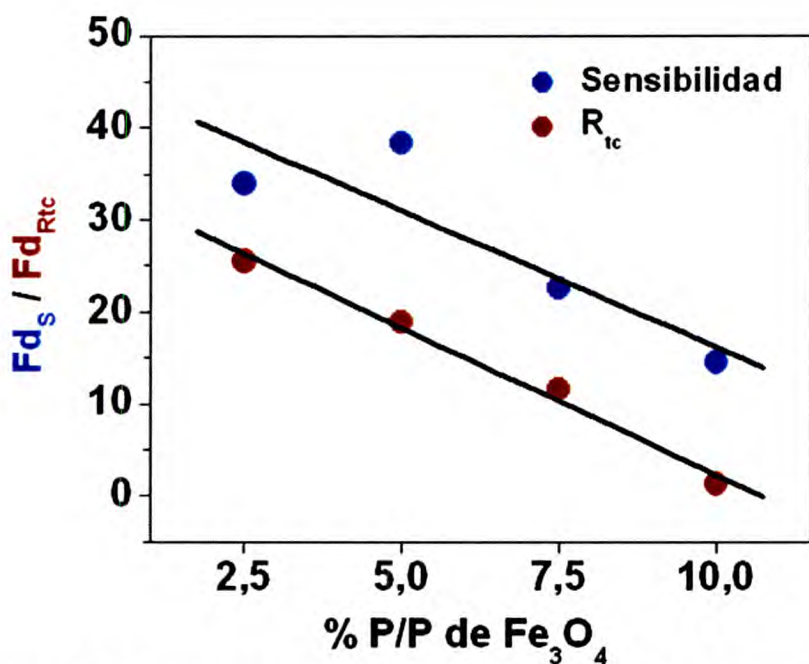


Figura 7. Variación en el aumento de la sensibilidad a peróxido de hidrógeno y la disminución de R_{tc} en función de distintas proporciones de Fe_3O_4 en CPE al incorporar albúmina 5,0 % P/P en el compuesto. Datos obtenidos de la **Figura 2** y **6**.

La **Figura 8** muestra la influencia de la cantidad de Alb incorporada en CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P en la respuesta de impedancia electroquímica. En la **Tabla 5** se indican los valores de R_{tc} obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales para las distintas plataformas. Según los valores de R_{tc} se observa que, conforme aumenta la proporción de proteína en el compuesto conteniendo nanopartículas, R_{tc} disminuye. En

acuerdo con el incremento de la sensibilidad observada en los experimentos amperométricos antes presentados, estos resultados señalan que un incremento en la cantidad de Alb permite una mayor y más eficiente actividad electrocatalítica de la superficie electródica modificada con Fe_3O_4 hacia la reducción del peróxido de hidrógeno. Este efecto es consecuencia de una mejor distribución superficial del nanomaterial electrocatalítico en presencia de la proteína.

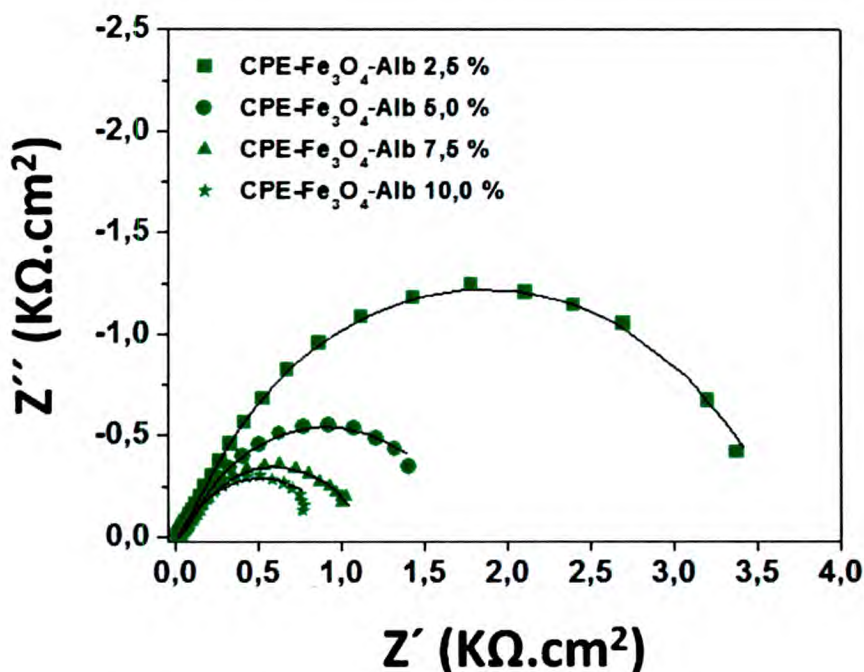


Figura 8. Diagramas de Nyquist obtenidos sobre CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P conteniendo diferentes cantidades de albúmina. Otras condiciones como en la **Figura 5**.

Contenido de Alb (% P/P) en CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P	R_{tc} ($\text{K}\Omega\cdot\text{cm}^2$)
2,5	(3,3 ± 0,8)
5,0	(1,8 ± 0,6)
7,5	(1,2 ± 0,1)
10,0	(0,8 ± 0,2)

Tabla 5. Valores de R_{tc} obtenidos de los diagramas de Nyquist como los de la **Figura 7**.

3.4. Estudio de la incorporación de otras proteínas a CPE-Fe₃O₄

Se realizaron estudios sobre plataformas de CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con GOx, a los fines de comparar su respuesta a peróxido de hidrógeno en relación a la obtenida utilizando los compósitos conteniendo Alb.

En la **Tabla 6** se muestran los parámetros analíticos calculados a partir de las curvas de calibración de los registros amperométricos a -0,100 V para adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE y CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificadas con distintos porcentajes de GOx. Se observa que la sensibilidad obtenida al modificar CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P con GOx muestra un notable incremento para todas las proporciones de proteína estudiadas. Por ejemplo, con 5,0 y 10,0 % P/P de GOx, la sensibilidad aumenta en un factor de 28 y 34, respectivamente, si se la compara con el valor obtenido con CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P ($(3,0 \pm 0,3) \mu\text{AM}^{-1}$). Es posible afirmar que, como en el caso de los compósitos modificados con Alb, existe un efecto sinérgico frente a la respuesta amperométrica de la reducción del peróxido de hidrógeno, debido a la asociación entre las nanopartículas y proteína que permite una mejor dispersión del catalizador.

Compósito	Sensibilidad (μAM^{-1})	Límite de detección (mM)	Intervalo lineal hasta (mM)	Coefficiente de correlación (r^2)	Repetitividad intersuperficie
CPE-GOx 5,0 %	$1,11 \pm 0,04$	0,478	14	0,996	12,8 %
CPE-GOx 10,0 %	$3,6 \pm 0,7$	0,213	14	0,994	32,8%
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 2,5 %	31 ± 5	0,160	12	0,990	12,6 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 5,0 %	85 ± 3	0,046	16	0,995	10,9 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 7,5 %	98 ± 5	0,115	14	0,994	4,5 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 10 %	102 ± 5	0,102	14	0,998	5,4%

Tabla 6. Parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para peróxido de hidrógeno sobre CPE, y CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con distintas proporciones de GOx. Otras condiciones como en la **Figura 2**.

Un dato importante es que para todas las proporciones de Alb y GOx estudiadas no solo la sensibilidad fue incrementada, sino que también se amplió el intervalo lineal del sensor al incorporar el material proteico en CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P.

Por otro lado y como se observó para Alb, la incorporación de GOx a CPE mejora la respuesta hacia la reducción del marcador. Al comparar las **Tablas 3 y 6** los parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos sobre los compósitos conteniendo únicamente 5,0 y 10,0 % P/P de proteína, las sensibilidades hacia la reducción del peróxido de hidrógeno para todos los casos son superiores a las encontradas con CPE ((0,50 ± 0,03) μAM⁻¹) demostrando que, conforme aumenta el contenido de proteína, el incremento en la respuesta amperométrica se hace más importante. Se observa también que en forma general la linealidad del sensor mejora sustancialmente al incorporarse únicamente proteína en el material carbonáceo respecto al valor encontrado con CPE (hasta 10 mM). Esto indica que existe una fuerte dependencia de la naturaleza y cantidad de proteína en CPE frente al desempeño del sensor. Pero esta mejora no es de la misma magnitud que la encontrada cuando el sistema CPE-proteína se combina con el poder electrocatalítico preferencial hacia peróxido de hidrógeno de las nanopartículas de Fe₃O₄. Esto último mencionado se analizará en mayor detalle más adelante.

Como puede observarse al comparar la **Tabla 3 y 6**, los compósitos con Alb incorporada en CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P muestran sensibilidades superiores y límites de detección de menores para todas las proporciones de proteína en comparación con la modificación con GOx. Además, la incorporación en CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P de cantidades de GOx superiores a 5,0 % P/P no resulta en un aumento sustancial de la sensibilidad como el observado al utilizar Alb (**Figura 4**). Esto último da cuenta de un límite alcanzado en lo que respecta a la cantidad de GOx en el compósito y su efecto dispersivo hacia las nanopartículas de Fe₃O₄.

Un resultado muy interesante es el obtenido a partir del análisis de la repetitividad intersuperficie. Este parámetro es calculado por medio de la desviación estándar del promedio de las sensibilidades a peróxido de hidrógeno obtenidas para diferentes superficies. En todos los casos la incorporación del material proteico a CPE y CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P produce una significativa mejora en la repetitividad. Por ejemplo, para la modificación con 5,0 % P/P de proteína en CPE la repetitividad disminuye de 32

a 10 % aproximadamente con GOx y Alb. Para la misma modificación pero empleando CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P, la repetitividad intersuperficie, también es mejorada desde 37 a 10 % aproximadamente para ambas proteínas. También se observa que para ambos casos, este efecto es más marcado a medida que la proporción del dispersante aumenta. En forma general, para los compósitos conteniendo Alb la repetitividad intersuperficie es mucho mejor que la obtenida modificando CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P con GOx. Obsérvese también, que para CPE-proteína 10,0 % P/P se encuentra una menor repetitividad intersuperficie al compararla con CPE-proteína 5,0 % P/P, indicando menor homogeneidad en la fase conductora con esta proporción de biomolécula.

Estos resultados demuestran que con los compósitos conteniendo proteína en su matriz se alcanza una dispersión más homogénea de las nanopartículas catalíticas y del componente conductor, permitiendo obtener reactividades similares entre las superficies electródicas al renovarlas tras el pulido del material compósito. Al analizar las **Tablas 3 y 6**, CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con proteína 5,0 % P/P es el que presenta la mejor "performance" analítica, ya que con esta cantidad de biomolécula en el compósito se obtiene el mejor compromiso en todos los parámetros analizados. A su vez el compósito con Alb incorporada es el que mejor desempeño presenta entre las dos proteínas estudiadas.

Con el objeto de inferir acerca de la influencia de la naturaleza de la proteína incorporada en la dispersión de las nanopartículas de Fe₃O₄ electrosintetizadas y en la reducción a peróxido de hidrógeno, se estudió la respuesta electroquímica de CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P al modificarla con 5,0 % P/P de otras proteínas de tamaños y estructuras terciarias distintas.

En la **Tabla 7** se presentan las sensibilidades obtenidas para peróxido de hidrógeno a -0,100 V utilizando CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con 5,0 % P/P de diferentes proteínas. Como puede observarse, en todos los casos existe un considerable aumento en la sensibilidad respecto al electrodo que contiene únicamente el electrocatalizador (12, 28, 29, 33, 38, y 52 veces superior para insulina, GOx, ovolisozima, mucina, albúmina y caseína, respectivamente). Los demás parámetros analíticos obtenidos a partir de los registros amperométricos, como la linealidad y sobre todo la repetitividad intersuperficie son mejorados al incorporar la proteína en el compósito conteniendo el electrocatalizador (no mostrado). Si bien Cas

presenta la mayor sensibilidad, del análisis de los resultados se desprende que la plataforma modificada con Alb es la que mejor desempeño analítico presentó en todos los casos. Con estos resultados es posible afirmar que el poder dispersivo sobre las nanopartículas de Fe_3O_4 en el compósito es fuertemente dependiente de la naturaleza de la proteína.

Compósito	Sensibilidad (μAM^{-1})
CPE-Fe_3O_4 5,0 %	3,0 \pm 0,3
CPE-Fe_3O_4 5,0%-Insulina 5,0%	37 \pm 3
CPE-Fe_3O_4 5,0%-GOx 5,0%	85 \pm 3
CPE-Fe_3O_4 5,0%-Ovolizozima 5,0%	87 \pm 9
CPE-Fe_3O_4 5,0%-Mucina 5,0%	99 \pm 5
CPE-Fe_3O_4 5,0%-Albúmina 5,0%	115 \pm 7
CPE-Fe_3O_4 5,0%-Caseína 5,0%	156 \pm 8

Tabla 7. Efecto de la presencia de diferentes proteínas en CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P en la sensibilidad obtenida hacia peróxido de hidrógeno. Otras condiciones como en la **Figura 2**

La **Figura 9** presenta los valores de R_{tc} obtenidos a partir de experimentos de EIE para los compósitos conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de las proteínas previamente mencionadas. Las R_{tc} para todos los casos estudiados son un orden de magnitud menores en comparación con las R_{tc} obtenidas para CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P demostrando que la transferencia electrónica se encuentra más facilitada en presencia de las proteínas debido al efecto dispersivo que producen en los compósitos conteniendo Fe_3O_4 . Se observa, también, que la R_{tc} presenta diferencias de acuerdo con la naturaleza de las proteínas incorporadas en los compósitos conteniendo Fe_3O_4 . Por ejemplo, la R_{tc} para el compósito modificado con insulina quintuplica y duplica a las obtenidas con Alb y GOx, respectivamente.

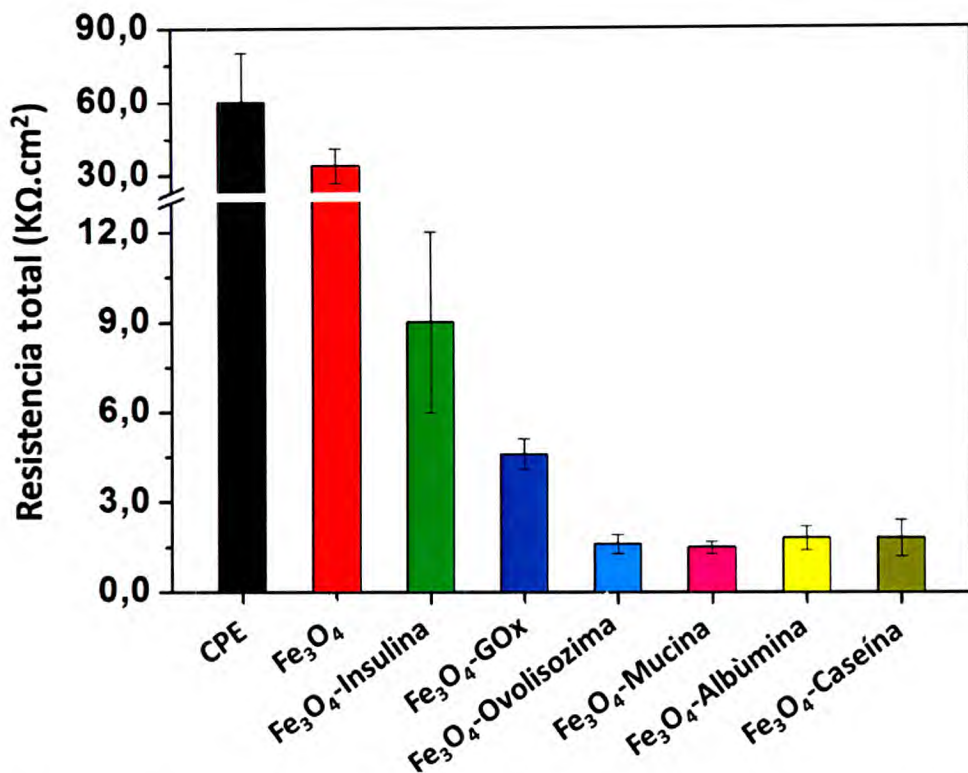


Figura 9. Resistencias de transferencia de carga (R_{tc}) obtenidas a partir de espectros de EIE para CPE-Fe₃O₄ y CPE-Fe₃O₄ conteniendo 5,0 % P/P de distintas proteínas. Otras condiciones como en la Figura 5.

Si bien se trata de un sistema complejo, en el que intervienen muchas variables, es posible encontrar ciertos patrones y relaciones entre la naturaleza proteica y el comportamiento electroquímico de los electrodos compósitos modificados con Fe₃O₄ y proteína. En este aspecto y sobre la base de los resultados presentados, es posible afirmar que la sensibilidad a peróxido de hidrógeno es más alta y la R_{tc} más baja cuando el carácter hidrofóbico de la proteína es mayor, como es el caso de la incorporación de Alb y Cas.

En este sentido, son numerosos los trabajos que mencionan la formación de una “corona biomolecular” mediante la adsorción espontánea de proteínas sobre la superficie de diversas nanopartículas, siendo determinante en dicha interacción, el grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad tanto de la biomolécula como del nanomaterial [29, 34–36]. En este sentido, por ejemplo, el interior hidrofóbico de una proteína globular interactuará favorablemente con la superficie de una nanopartícula no polar y en muchos casos la formación de la corona biomolecular rodeando a la nanopartícula exigirá un importante cambio conformacional de la

biomolécula. Esta adsorción no sólo está fuertemente relacionada a la naturaleza físico-química de la interacción nanopartícula-proteína, sino también al tamaño de la nanopartícula en relación al de la proteína, es decir al grado de curvatura superficial del nanomaterial, como así también a la conformación tridimensional de la macromolécula en estado nativo [37, 38]. Cabe mencionar que la presencia de moléculas proteicas adsorbidas sobre nanopartículas les confiere nuevas características superficiales, proporcionando en muchos casos una eficiente vía de funcionalización para dispersarlas en diferentes medios.

El surfactante utilizado en la electrosíntesis de Fe_3O_4 y adsorbido sobre la nanopartícula, $((\text{CH}_3)_4\text{NCl})$, además de ejercer una función estabilizadora, le otorga una superficie hidrofóbica, por lo que es muy probable que esa cubierta facilite una interacción de naturaleza apolar con la proteína. Es importante destacar que en la preparación de los compósitos, antes de incorporar el grafito, se mezclaron por 10 minutos la proteína y las nanopartículas de Fe_3O_4 , previamente dispersadas en el aceite mineral, de modo de lograr el mayor contacto entre ambos componentes. En este sentido, la adsorción de Alb sobre Fe_3O_4 propiciaría características superficiales diferentes a las nanopartículas electrosintetizadas, tendientes a una mayor dispersión del nanocatalizador en el material compósito.

Recientemente Jedlovsky-Hajdu y colaboradores [28] estudiaron la influencia en la formación inmediata de la corona biomolecular sobre nanopartículas de Fe_3O_4 estabilizadas con ácido cítrico, ácido poliacrílico y ácido oleico al incubarlas con proteínas del plasma sanguíneo humano. Los autores afirman que la consecuente emergencia de bio-nano-interfases con diferentes composiciones y estructuras está condicionada por la naturaleza del estabilizante superficial de la nanopartícula. En este último aspecto se menciona que el cubrimiento hidrofóbico sobre Fe_3O_4 por parte del ácido oleico cumple un rol característico y determinante en la interacción de la nanopartícula con las proteínas plasmáticas ya que en la superficie del nanomaterial se forma una corona biomolecular fuertemente enriquecida en Alb y lipoproteínas luego de su incubación en plasma sanguíneo humano [28].

En los resultados mostrados, además del carácter hidrofóbico de la proteína, se observa que si el tamaño y forma de la biomolécula (en estado nativo) son similares a los de la nanopartícula $((20 \pm 4) \text{ nm})$, la sensibilidad y la R_{tc} respecto a

CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P mejora notablemente. En este aspecto, por ejemplo, la estructura lineal de la insulina presenta un carácter hidrófilico, y es la más pequeña de todas las proteínas estudiadas (5,9 KDa) [39] y los compósitos con Fe₃O₄ y dicha proteína presentan la menor sensibilidad y la mayor R_{tc}. Por otro lado, para el caso de una proteína de alto peso molecular como Muc (546 KDa), fuertemente hidrofílica ya que contiene una densa capa de residuos glicosilados formando cadenas laterales alrededor del polipéptido lineal central [40], se observa que la R_{tc} obtenida está dentro de los menores valores encontrados. Sin embargo su tamaño no se traduce en una mejora considerable en la sensibilidad si se la compara con la obtenida con proteínas más de mil veces pequeñas como es el caso de Alb (66,4 KDa) y Cas (22 a 28 KDa). Es muy probable que la interacción de la densa capa hidrofílica de Muc con las nanopartículas de Fe₃O₄ no permita una asociación entre ambos componentes tan eficiente como en el caso de Alb y Cas.

Es importante mencionar que la Cas en un ambiente hidrofílico como el suero de la leche, se encuentra como suspensión de partículas esféricas (micelas), hidrofílicas en el exterior e hidrofóbicas en el interior. En la **Tabla 7** se observa que al incorporar estas proteínas a CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P se obtiene la mayor sensibilidad ((156 ± 8) μAM⁻¹) debido a la naturaleza anfipática y globular de la macromolécula [41]. Para el caso de Alb, si bien también expone una superficie hidrofílica en medios acuosos como la sangre, posee grandes “bolsillos” hidrofóbicos distribuidos en la molécula de forma asimétrica capaces de transportar diversas moléculas biológicas liposolubles (ácidos grasos, bilirrubina, hormonas esteroideas, fármacos). Su forma elipsoidal compacta y sus dimensiones (4 x 14 nm) son próximos a los de las nanopartículas de Fe₃O₄ [42–44] y no posee azúcares en su estructura. En forma general y en contraposición con proteínas de menor cantidad de dominios hidrofóbicos en su estructura, esta característica permitiría a Alb y Cas asociarse superficialmente al nanomaterial con una mayor afinidad para luego propiciar una dispersión de Fe₃O₄ más eficiente en el compósito.

Como puede observarse en la **Tabla 7** y **Figura 9**, el electrodo compósito construido con GOx (160 KDa) demostró valores de sensibilidad y R_{tc} entre los obtenidos con Ins y el resto de las proteínas estudiadas. Esta enzima, de estructura globular dimérica y elipsoidal, es una glicoproteína con un contenido de azúcares de

16 % P/P con respecto a su masa total. Aunque en estado nativo posee dimensiones (7 nm x 5,5 nm x 8 nm) cercanas a las nanopartículas de Fe₃O₄ su estructura no le permitiría interactuar e integrarse eficientemente con la superficie hidrofóbica de la nanopartícula como la lograda con Cas y Alb [45–47].

La ovalizozima es una proteína de 14,7 KDa, cuyos residuos hidrofóbicos orientados hacia el centro de la proteína generan un pequeño interior apolar en estado nativo, exponiendo una superficie polar para poder encontrarse disuelta en el medio intracelular y extracelular [45, 46]. Como es de esperar, se obtuvieron valores intermedios de sensibilidad amperométrica con esta proteína ya que presenta menor carácter hidrofóbico y un menor tamaño respecto a Cas y Alb.

Con fines comparativos, también se estudió la respuesta amperométrica a peróxido de hidrógeno incorporando a CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P un polisacárido lineal como el quitosano (5,0 % P/P) que tiene naturaleza hidrofílica ya que presenta en su estructura grupos hidroxilos y amino, obteniéndose una sensibilidad de $(27 \pm 2) \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$. Si se compara con la sensibilidad hallada con CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P, queda claro que la modificación de los compósitos con otro tipo de macromoléculas facilitaría también la dispersión de las nanopartículas de Fe₃O₄, aumentando la superficie electrocatalítica expuesta. Sin embargo, nuevamente se comprueba que la incorporación de macromoléculas de características hidrofílicas no favorece en la misma magnitud la dispersión de las nanopartículas de Fe₃O₄ en el sensor observada con biomoléculas con mayor carácter hidrofóbico en su estructura.

Por lo tanto, con estos resultados es posible concluir que la naturaleza, el tamaño y la forma de la proteína juegan un rol muy importante en la dispersión de las nanopartículas en el compósito.

Con el objetivo de determinar si un cambio estructural en las proteínas tiene incidencia en la respuesta electroquímica, se incorporaron Alb y GOx previamente sometidas a desnaturalización térmica (80 °C durante una hora). En la **Tabla 8** se muestran los parámetros analíticos obtenidos sobre CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificados con 5,0 % P/P Alb y GOx. Al incorporar las proteínas tratadas térmicamente a CPE-Fe₃O₄, la sensibilidad disminuye sólo un 22 y 14 %, respectivamente en comparación con los compósitos conteniendo proteína sin desnaturalizar. Esto daría

cuenta de que el arreglo estructural de la proteína es importante, ya que al desnaturalizarla la respuesta electroquímica del sensor cambia.

Compósito	Condiciones	Sensibilidad ($\mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$)	Intervalo lineal hasta (mM)	Coefficiente de correlación (r^2)	Repetitividad intersuperficie
CPE-Fe ₃ O ₄ -Alb 5,0 %	Mantenida a -20 °C	115 ± 7	14	0,991	7,2 %
	80 °C	99 ± 5	10	0,995	7,6 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 5,0 %	Mantenida a -20 °C	85 ± 3	16	0,995	11,1 %
	80 °C	66 ± 7	16	0,995	12,0 %

Tabla 8. Parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para peróxido de hidrógeno sobre CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con 5,0 % P/P de GOx y Alb conservadas en freezer y tratadas a 80 °C por una hora. Otras condiciones como en la **Figura 2**.

3.5. Estudio de la influencia de la presencia y tipo de surfactante en la superficie de las nanopartículas de Fe₃O₄

Se estudió el efecto del surfactante empleado en la síntesis electroquímica de las nanopartículas de Fe₃O₄ en la R_{tc} para la reducción de peróxido de hidrógeno mediante experimentos de EIE. Como se explicó en el capítulo II, la adsorción electrostática de surfactantes amoniacal sobre la superficie de Fe₃O₄ durante la electrosíntesis, permite un mejor control del tamaño de las nanopartículas obtenidas y disminuye su agregación. Los surfactantes utilizados fueron cloruro de tetrametil amonio ((CH₃)₄NCl) y bromuro de trimetilhexadecilamonio ((CH₃)₃(CH₃(CH₂)₁₅)NBr).

Como se mencionó anteriormente, cuando CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P conteniendo nanopartículas sintetizadas en presencia de (CH₃)₄NCl es modificado con 5,0 % P/P de Alb, la disminución producida en el valor de R_{tc} es en un factor de 18,9 (ver **Tabla 4**). De la misma forma, al modificar los compósitos conteniendo Fe₃O₄ sintetizadas en presencia (CH₃)₃(CH₃(CH₂)₁₅)NBr 5,0 % P/P Alb, no se obtuvo disminución del valor de R_{tc} en relación a CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P. Teniendo en cuenta el microambiente hidrofóbico y la extensión de la cadena alifática del (CH₃)₃(CH₃(CH₂)₁₅)NBr, estos

resultados evidencian que la dispersión de Fe_3O_4 conteniendo el surfactante más largo adsorbido en su superficie, propiciaría una mejor dispersión de las nanopartículas en la matriz compósita que las que poseen el surfactante más corto y la incorporación de la proteína en el compósito no implicaría un incremento adicional en la dispersión de Fe_3O_4 .

Con el fin de analizar la incidencia del surfactante se analizó la incorporación de nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas químicamente (Fe_3O_4 (SQ)) de distintos tamaños.

En la **Figura 10** se muestra el efecto de la incorporación de 5,0 % P/P de Alb en CPE- Fe_3O_4 (SQ) 5,0 % en las sensibilidades y R_{tc} obtenidas a partir de compósitos preparados con nanopartículas de Fe_3O_4 (SQ) de 9 y 30 nm de diámetro. Para las distintas plataformas, se analizaron las sensibilidades para peróxido de hidrógeno obtenidas por amperometría a -0,100 V (barras lila) y los valores de R_{tc} obtenidos mediante E.I.E, utilizando el mismo analito como sonda (barras naranja).

Como puede observarse, para ambos tamaños de nanopartícula, al incorporar 5,0 % P/P de Alb en CPE- Fe_3O_4 (SQ) 5,0 %, se produce un importante aumento de sensibilidad hacia la reducción del marcador acompañado por una disminución de R_{tc} . De esta forma, es posible afirmar que la formación de una corona proteica sobre la superficie hidrofílica de estas nanopartículas (determinada por grupos Fe-OH) propiciaría también, una notable mejora en la dispersión del nanomaterial en el compósito de grafito. En este aspecto, Casals y colaboradores demostraron la adsorción espontánea e irreversible de albúmina sérica bovina sobre la superficie inorgánica de nanopartículas de Fe_3O_4 y otros óxidos metálicos al dispersarlas en medios de cultivo celular [29]. Los autores afirman que a pesar de que las características de hidrofiliidad y carga superficial son similares entre los nanomateriales estudiados, se observa diferentes patrones en la formación de la corona biomolecular. Por otro lado, Mahmoudi y colaboradores compararon la adsorción de transferrina humana (77 KDa) sobre nanopartículas de Fe_3O_4 sin estabilizantes o cubiertas con polivinilalcohol, observando un cambio conformacional irreversible de la proteína al interactuar con el nanomaterial en ambos casos [50].

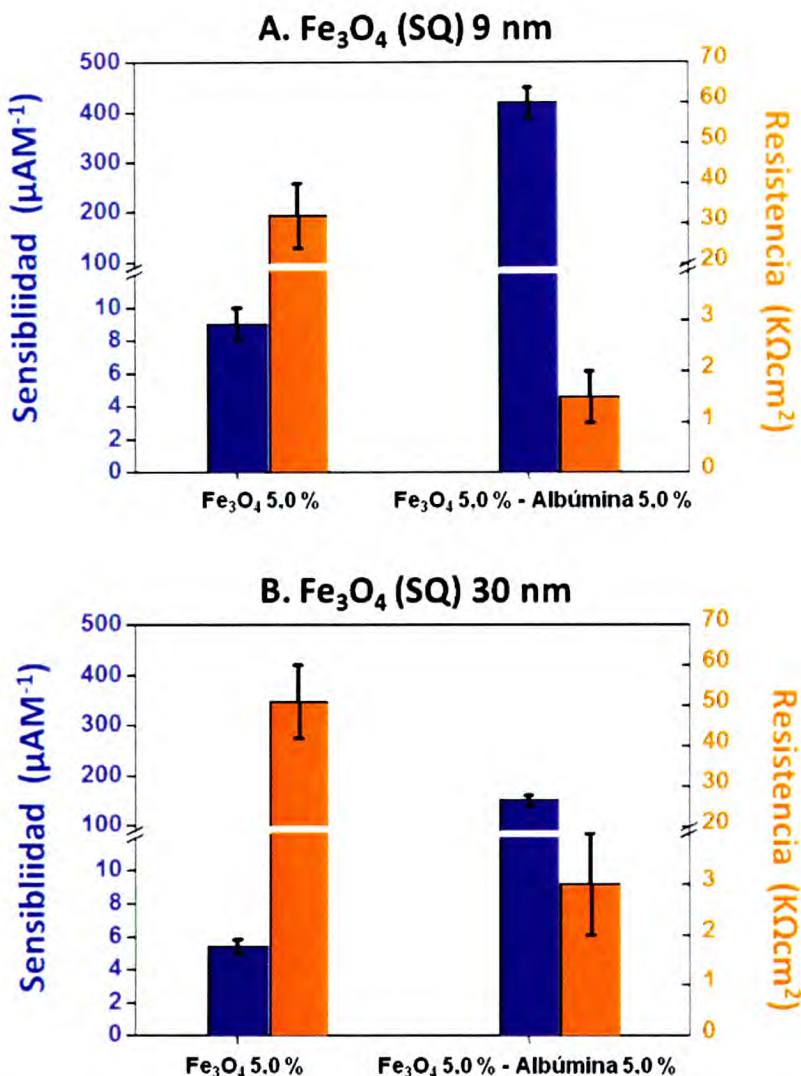


Figura 10. Sensibilidades y R_{tc} obtenidas sobre CPE conteniendo nanopartículas de Fe_3O_4 (SQ) de 9 y 30 nm de diámetro en ausencia y en presencia de Alb. Otras condiciones como en la **Figura 2** y **Figura 5** respectivamente

En la **Figura 10**, también se observa que existe una notable diferencia en cuanto a la respuesta electroquímica entre los compósitos conteniendo Fe_3O_4 (SQ) de distintos tamaños. Debido a la mayor superficie electrocatalítica expuesta, los compósitos preparados con las nanopartículas de Fe_3O_4 (SQ) de 9 nm son las que presentan la mayor sensibilidad y menor R_{tc} . Sin embargo el hallazgo más interesante es la diferencia encontrada al modificar los CPE- Fe_3O_4 (SQ) 5,0 % con 5,0 % P/P de Alb. Mientras que la sensibilidad incrementa en un factor de 28 cuando se incorpora la proteína en el compósito conteniendo la nanopartículas de 30 nm de diámetro, para el caso del compósito conteniendo Fe_3O_4 de 9 nm, el factor es de 48. Esto es

acompañado también en las diferentes magnitudes con la que disminuye R_{tc} , 17 y 21,3 veces para los compósitos preparados con Fe_3O_4 (SQ) de 30 y 9 nm respectivamente. Este mayor efecto dispersivo observado con las nanopartículas de 9 nm demostraría una vez más que una relación similar de tamaño entre la nanopartícula y la molécula de proteína es importante para lograr una más eficiente dispersión de la superficie electrocatalítica. En este aspecto diversos autores mencionan que no sólo el carácter hidrofóbico/hidrofílico de la nanopartícula es importante en la interacción entre nanomateriales y proteínas, sino que también lo es el efecto geométrico de la curvatura del nanomaterial. La adsorción de proteínas sobre la superficie de nanopartículas pequeñas (< 10 nm) tiende a sufrir menores cambios conformacionales que sobre nanopartículas más grandes. Además, una curvatura mayor de la superficie de la nanopartícula permite menos interacciones laterales entre las proteínas adjuntas y una monocapa más densa sobre la nanopartícula [48, 49]. Este diferente patrón superficial en la formación de la corona biomolecular sobre Fe_3O_4 (SQ) de 9 nm, propiciaría una mejor dispersión del nanomaterial en el compósito respecto de la nanopartículas de 30 nm.

3.6. Caracterización superficial

En la **Figura 11** se muestran las imágenes obtenidas mediante SEM correspondientes a CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P **(A)** y CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P conteniendo 5,0 % P/P de Alb **(B)**.

En el caso del compósito conteniendo sólo Fe_3O_4 5,0 % P/P se observa una superficie más irregular, con zonas que forman agregados de nanopartículas de mayor tamaño. Cuando Alb es incorporada, los agregados son más pequeños y dispersos, y se advierte una distribución superficial mucho más homogénea y una mejor integración del nanomaterial electrocatalítico.

Estas imágenes corroboran que la presencia de Alb facilita la dispersión de las nanopartículas en el compósito de grafito. Este efecto es traducido en una mayor sensibilidad y menor R_{tc} del sensor debido a un eficiente aumento de la superficie electrocatalítica expuesta. Por otra parte, el notable incremento de la repetitividad

intersuperficie al incorporar material proteico en el compuesto conteniendo las nanopartículas de Fe_3O_4 , es debido a una distribución más homogénea en el material eléctrico.

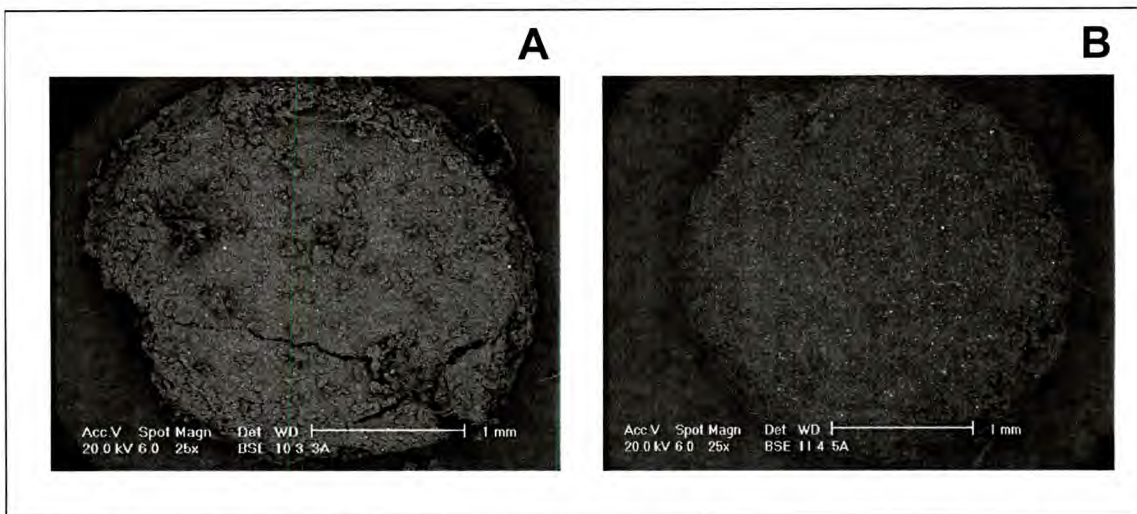


Figura 11. Imágenes obtenidas por SEM de un compuesto de pasta de grafito conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4) (A) y 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de albúmina (CPE- Fe_3O_4 -Alb) (B). Magnificación: 25 x.

4. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo demuestran las ventajas de la incorporación de proteínas a los compósitos de carbono modificados con nanopartículas de Fe_3O_4 debido a que presentan una mayor respuesta en la reducción del peróxido de hidrógeno. Experimentos electroquímicos y mediante SEM indican que la presencia de las proteínas aumenta considerablemente la superficie electrocatalítica expuesta a través de una más eficiente dispersión de las nanopartículas, disminuyendo R_{tc} y obteniendo una mayor sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno. Este efecto es fuertemente dependiente, no sólo de la relación entre las proporciones de nanopartícula y proteína, sino también de la naturaleza estructural de la biomolécula.

Durante la preparación de los compósitos, se propiciaría la adsorción de las moléculas de proteína a partir de interacciones de tipo hidrofóbicas sobre Fe_3O_4

conteniendo en su superficie un surfactante de cadena corta como $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$. De esta forma, las características superficiales de las nanopartículas electrosintetizadas serían modificadas, condicionando sustancial y favorablemente su interacción con el microambiente circundante, logrando una más eficiente dispersión en el material compósito.

Entre todos los compósitos estudiados, los mejores parámetros analíticos se obtuvieron con las plataformas modificadas con 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de Alb. La presencia de esta proteína en el compósito le otorga una distribución más homogénea a las nanopartículas y al material carbonáceo, traduciéndose en una mejor repetitividad entre las superficies electrónicas.

Esta estrategia plantea una nueva vía para mejorar las características analíticas de los (bio)sensores electroquímicos basados en electrodos compósitos de grafito y que utilizan nanopartículas electrocatalíticas. Caracterizar el efecto sinérgico que se produce a partir de la asociación de estos nanomateriales y las biomoléculas permite comprender, diseñar y mejorar el desempeño de estos electrodos compósitos con un mayor control.

5. Bibliografía

- [1] W. Chen, S. Cai, Q.-Q. Ren, W. Wen, Y.-D. Zhao, "Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review," *The Analyst*, vol. 137, Nro. 1, pp. 49–58, 2012.
- [2] I. L. De Mattos, K. A. Shiraishi, A. D. Braz, J. R. Fernandes, "Hydrogen peroxide: importance and determination," *Quim. Nova*, vol. 26, Nro. 6, pp. 373–380, 2003.
- [3] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 2, pp. 814–825, 2008.
- [4] E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, "Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice," *Sensors*, vol. 10, Nro. 5, pp. 4558–4576, 2010.
- [5] B. Tang, L. Zhang, K. Xu, "FIA-near-infrared spectrofluorimetric trace determination of hydrogen peroxide using tricarchlorobocyanine dye (Cy.7.Cl) and horseradish peroxidase (HRP)," *Talanta*, vol. 68, Nro. 3, pp. 876–882, 2006.
- [6] Z. Jiang, X. Liang, X. Lu, Q. Huang, "Colorimetric assay of H_2O_2 using Fe_3O_4 nanoparticles as a nanocatalyst," *Appl. Mech. Mater.*, vol. 299, pp. 195–198, 2012.

- [7] L. Li, L. He, Y. Tian, H. Wang, "A novel hydrogen peroxide sensor based on LaB 6 electrode," *Electrochim. Acta*, vol. 63, Nro. 29, pp. 64–68, 2012.
- [8] C. Yang, Z. Zhang, "Flow injection determination of hydrogen peroxide using diperiodatoargentate and diperiodatonickelate luminol chemiluminesc," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 92, Nro. 5, pp. 523–533, 2012.
- [9] K. De Wael, Q. Bashir, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, H. A. Heering, A. Adriaens, "Electrochemical determination of hydrogen peroxide with cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c entrapped in a gelatin hydrogel," *Bioelectrochemistry*, vol. 83, pp. 15–8, 2012.
- [10] S. Komathi, A. I. Gopalan, S.-K. Kim, G. S. Anand, K.-P. Lee, "Fabrication of horseradish peroxidase immobilized poly(N-[3-(trimethoxy silyl)propyl]aniline) gold nanorods film modified electrode and electrochemical hydrogen peroxide sensing," *Electrochim. Acta*, vol. 92, pp. 71–78, 2013.
- [11] X. B. Kang, G. C. Pang, X. Y. Liang, M. Wang, J. Liu, W. M. Zhu, "Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan," *Electrochim. Acta*, vol. 62, pp. 327–334, 2012.
- [12] G. Suárez, C. Santschi, O. J. F. Martin, V. I. Slaveykova, "Biosensor based on chemically-designed anchorable cytochrome c for the detection of H₂O₂ released by aquatic cells," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 42, pp. 385–390, 2013.
- [13] X. Liu, H. Feng, J. Zhang, R. Zhao, X. Liu, D. K. Y. Wong, "Hydrogen peroxide detection at a horseradish peroxidase biosensor with a Au nanoparticle-dotted titanate nanotube|hydrophobic ionic liquid scaffold," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 32, Nro. 1, pp. 188–194, 2012.
- [14] C.-J. Mao, X.-B. Chen, H.-L. Niu, J.-M. Song, S.-Y. Zhang, R.-J. Cui, "A novel enzymatic hydrogen peroxide biosensor based on Ag/C nanocables," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, Nro. 1, pp. 544–7, 2012.
- [15] M. S. M. Quintino, H. Winnischofer, K. Araki, H. E. Toma, L. Angnes, "Cobalt oxide/tetraruthenated cobalt-porphyrin composite for hydrogen peroxide amperometric sensors," *The Analyst*, vol. 130, Nro. 2. pp. 221–6, 2005.
- [16] H. Wei, E. Wang, "Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection use of the novel properties of Fe₃O₄ MNPs as peroxidase," *Anal. Chem.*, vol. 80, Nro. 6, pp. 2250–2254, 2008.
- [17] K.-C. Lin, C.-Y. Yin, S.-M. Chen, "An electrochemical biosensor for determination of hydrogen peroxide using nanocomposite of poly(methylene blue) and FAD hybrid film," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 157, Nro. 1, pp. 202–210, 2011.
- [18] W. Jia, M. Guo, Z. Zheng, T. Yu, E. G. Rodriguez, Y. Wang, Y. Lei, "Electrocatalytic oxidation and reduction of H₂O₂ on vertically aligned Co₃O₄ nanowalls electrode: Toward H₂O₂ detection," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 625, Nro. 1, pp. 27–32, 2009.

- [19] A. A. Ensafi, M. Jafari-Asl, B. Rezaei, "A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide- Co_3O_4 nanocomposite," *Talanta*, vol. 103, pp. 322–9, 2013.
- [20] J. Wang, G. Rivas, M. Chicharro, "Iridium Dispersed Carbon Paste Enzyme Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 8, Nro. 5, pp. 434–437, 1996.
- [21] S. A. Miscoria, G. D. Barrera, G. A. Rivas, "Enzymatic Biosensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified with Gold Nanoparticles and Polyphenol Oxidase," *Electroanalysis*, vol. 17, Nro. 17, pp. 1578–1582, 2005.
- [22] R. Devi, S. Relhan, C. S. Pundir, "Construction of a chitosan/polyaniline/graphene oxide nanoparticles/polypyrrole/Au electrode for amperometric determination of urinary/plasma oxalate," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, pp. 17–26, 2013.
- [23] S. K. Vashist, D. Zheng, K. Al-Rubeaan, J. H. T. Luong, F.-S. Sheu, "Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, Nro. 2, pp. 169–88, 2011.
- [24] X. Li, Y. Zhou, Z. Zheng, X. Yue, Z. Dai, S. Liu, Z. Tang, "Glucose biosensor based on nanocomposite films of CdTe quantum dots and glucose oxidase," *Langmuir ACS J. surfaces colloids*, vol. 25, Nro. 11, pp. 6580–6586, 2009.
- [25] I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, "Carbon paste electrodes in the new millennium," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 7, Nro. 4, pp. 598–656, 2009.
- [26] I. Kohli, S. Alam, B. Patel, A. Mukhopadhyay, "Interaction and diffusion of gold nanoparticles in bovine serum albumin solutions," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, Nro. 20, pp. 203705–203709, 2013.
- [27] S. K. Swain, D. Sarkar, "Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 286, pp. 99–103, 2013.
- [28] A. Jedlovszky-Hajdú, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, E. Tombácz, K. a Dawson, "Surface coatings shape the protein corona of SPIONs with relevance to their application in vivo," *Langmuir ACS J. surfaces colloids*, vol. 28, Nro. 42, pp. 14983–14991, 2012.
- [29] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. F. Puentes, "Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe_3O_4 , CoO, CeO_2) nanoparticles," *Small*, vol. 7, Nro. 24, pp. 3479–3486, 2011.
- [30] N. P. Sasidharan, P. Chandran, S. Sudheer Khan, "Interaction of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin and its adsorption isotherms and kinetics," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 102, pp. 195–201, 2013.
- [31] H. Ruh, B. Kühn, G. Brenner-Weiss, C. Hopf, S. Diabaté, C. Weiss, "Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials.," *Toxicol. Lett.*, vol. 208, Nro. 1, pp. 41–50, 2012.
- [32] L. C., Z. W. Zhiming Chen, Zhenglian Xue, Lin Chen, a Zhirong Geng, Renchun Yang, "One-pot template-free synthesis of water-dispersive Fe_3O_4 @C nanoparticles for

adsorption of bovine serum albumin," *New J. Chem.*, vol. 37, Nro. 11, pp. 3731–3736, 2013.

- [33] P. Kumari, P. Majewski, "Adsorption of Albumin on Silica Surfaces Modified by Silver and Copper Nanoparticles," *J. Nanomater.*, vol. 2013, pp. 1–7, 2013.
- [34] E. Casals, V. F. Puentes, "Inorganic nanoparticle biomolecular corona: Formation, evolution and biological impact," *Nanomedicine*, vol. 7, Nro. 12, pp. 1917–1930, 2012.
- [35] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. Puentes, "Time evolution of the nanoparticle protein corona," *ACS Nano*, vol. 4, Nro. 7, pp. 3623–3632, 2010.
- [36] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, Nro. 7, pp. 2780–2799, 2012.
- [37] A. A. Shemetov, I. Nabiev, A. Sukhanova, "Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 6, Nro. 6, pp. 4585–4602, 2012.
- [38] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, "Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, Nro. 38, pp. 14265–14270, 2008.
- [39] J. P. Cartailleur, "The Structure of Insulin," *Beta Cell Biol. Consort.*, pp. 1–2, 2013.
- [40] G. E. Yakubov, A. Papagiannopoulos, E. Rat, R. L. Easton, T. A. Waigh, "Molecular structure and rheological properties of short-side-chain heavily glycosylated porcine stomach mucin," *Biomacromolecules*, vol. 8, Nro. 11, pp. 3467–3677, 2007.
- [41] D. S. Horne, "Casein structure, self-assembly and gelation," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 7, Nro. 5–6, pp. 456–461, 2002.
- [42] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, "Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 5, pp. 827 – 835, 1998.
- [43] Sigma-Aldrich, "Albumin from bovine serum," *Product information*, pp. 2–5, 1990.
- [44] A. A. Spector, "Structure and lipid binding properties of serum albumin," *Methods Enzymol.*, vol. 128, pp. 320–339, 1986.
- [45] J. H. Pazur, K. Kleppe, A. Cepure, "A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 11, Nro. 2, pp. 351–357, 1965.
- [46] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg, "Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Angstrom of resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 229, Nro. 1, pp. 153–172, 1993.
- [47] R. Wilson, A. P. F. Turner, "Glucose oxidase: an ideal enzyme," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 7, pp. 165–185, 1992.

- [48] K. P. Wilson, B. A. Malcolm, B. W. Matthews, "Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg white lysozyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, Nro. 15, pp. 10842–10849, 1992.
- [49] C. C. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, "Structure of hen egg-white lysozyme. A three dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution," *Nature*, vol. 206, Nro. 4986. pp. 757–761, 22-May-1965.
- [50] M. Mahmoudi, M. A. Shokrgozar, S. Sardari, M. K. Moghadam, H. Vali, S. Laurent, P. Stroeve, "Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 3, Nro. 3, pp. 1127–1138, 2011.

Capítulo V

***Desarrollo de un biosensor enzimático
para glucosa a partir de
compósitos de grafito
conteniendo
nanopartículas de Fe_3O_4***

1. Introducción

El desarrollo de metodologías nuevas y confiables para la cuantificación rápida, sensible y selectiva de diferentes analitos de interés biomédico, fármaco-toxicológico, industrial y ambiental, ha recibido considerable atención en las últimas décadas. Los biosensores electroquímicos demostraron ser una de las principales estrategias, y dentro de ellos los enzimáticos han concitado gran interés. En este sentido, el desarrollo de biosensores para glucosa es de gran importancia a nivel mundial debido a que la detección de este metabolito es crucial en las personas que padecen diabetes. Esta enfermedad es de origen metabólico y presenta una alta prevalencia, la padecen 347 millones de la población mundial y es causa de muchas muertes [1]. Es una enfermedad crónica y progresiva, que si no se la controla genera una serie de complicaciones dañando ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos. Sus complicaciones agudas (hiperglucemia, cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetósico) son consecuencia de un control inadecuado de la enfermedad, mientras que las crónicas (cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y daños microvasculares) son debido al progreso de la enfermedad. Éstas pueden evitarse en la mayoría de los casos con la prevención y control de manera descentralizada; de allí el interés en el desarrollo de métodos rápidos, confiables y robustos para detectar los niveles de glucosa en fluidos biológicos [2–4].

El primer bioelectrodo enzimático para determinar glucosa fue desarrollado por Clark y Lyons [5]. Con este dispositivo se determinaba el consumo de oxígeno a medida que ocurría la reacción catalizada por glucosa oxidasa, que estaba atrapada en una membrana de diálisis semipermeable sobre un electrodo de platino. Este dispositivo presentaba la necesidad de dos electrodos de trabajo y la determinación de corrientes diferenciales, con el objeto de corregir la importante variación de oxígeno basal. Por esta razón surgió un gran interés en el desarrollo de biosensores de primera generación, capaces de cuantificar glucosa a partir de la generación enzimática de peróxido de hidrógeno. Tal y como se mencionó en capítulos anteriores, existe una gran desventaja debida a los altos sobrepotenciales necesarios para llevar a cabo la determinación del peróxido de hidrógeno sobre electrodos de carbono. Esto hace que

la cuantificación de glucosa sea muy inespecífica a causa de la interferencia de compuestos fácilmente oxidables presentes en fluidos biológicos como AA y AU. Se han diseñado numerosas estrategias tendientes a lograr mayor sensibilidad y mejor selectividad. Las más destacadas son la incorporación de materiales electrocatalíticos junto al componente de biorreconocimiento. La localización próxima entre centros electrocatalíticos y biocatalíticos propicia una rápida y sensible respuesta al analito contribuyendo, además, a la miniaturización de los dispositivos. En este sentido, la modificación de electrodos con nanotubos de carbono y grafeno [6–14] así como también con micro y nanopartículas metálicas y sus óxidos han sido los materiales más utilizados en los últimos años [15–20].

La aplicación de nanopartículas metálicas y sus óxidos en biosensores enzimáticos de glucosa representa una excelente alternativa en el desarrollo de plataformas sensibles, selectivas y robustas debido a sus características inherentes como la alta relación superficie/volumen, reactividad química y actividad electrocatalítica. Se ha demostrado que las nanopartículas metálicas contribuyen a la transferencia electrónica de la enzima hacia el electrodo, mejorando significativamente la señal de detección del analito [21].

Debido a su efecto electrocatalítico, es posible detectar glucosa a partir de la óxido-reducción del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente, utilizando nanopartículas de metales de transición tales como Au [11, 12, 14], [22–25], Pt [26–28], Ag [29, 30] Pd [31, 32], Cu [33], Ni [34], así como también de óxidos de Zn [35], Cu [36] y Mn [37, 38], entre los más estudiados. Son numerosos los diseños propuestos para el desarrollo de plataformas de biodetección de glucosa a partir de nanopartículas y su combinación con otros materiales, por ejemplo para el caso de las nanopartículas de oro, éstas han sido encapsuladas en matrices mesoporosas de sílica, polímeros biocompatibles y conductores [22, 23, 25], como así también junto a nanomateriales como los nanotubos de carbono [11, 12, 14] y grafeno [13].

La incorporación de nanopartículas de óxidos de hierro en biosensores de glucosa surge como una promisoriosa alternativa debido a su fácil preparación, funcionalización, biocompatibilidad y estabilidad. En comparación con otro tipo de nanopartículas, el desarrollo de biosensores construidos a partir de nanoestructuras de óxidos de hierro

ha recibido escasa atención. Sin embargo desde que Yan y colaboradores [39] reportaron que las nanopartículas de Fe_3O_4 poseen una actividad intrínseca que mimetiza las peroxidasas naturales, en los últimos años se han reportado algunos trabajos que indican diversas aplicaciones de este accesible y novedoso nanomaterial para la detección de glucosa [40–47]. Sin embargo, es importante destacar que hasta el momento, las nanopartículas de Fe_3O_4 utilizadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos han sido sintetizadas mediante el método de coprecipitación, no habiendo antecedentes del empleo de nanopartículas sintetizadas electroquímicamente con dichos fines.

En este capítulo se describe el uso de nanopartículas electrosintetizadas de Fe_3O_4 y dispersadas en electrodos compósito de carbono, para la fabricación de un biosensor amperométrico de glucosa. Esta estrategia se basa en la incorporación de GOx en la matriz carbonácea junto al nanomaterial electrocatalítico. De esta forma, se busca explotar el efecto catalítico preferencial de Fe_3O_4 hacia la reducción del peróxido de hidrógeno previamente estudiado en los capítulos III y IV. Se analizó la influencia de las condiciones de preparación de los electrodos compósito en los parámetros analíticos del biosensor y se evaluó su utilidad en la cuantificación de glucosa en muestras reales complejas como el suero sanguíneo humano.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Se utilizó glucosa oxidasa (GOx) obtenida de *Aspergillus niger*, EC-1.1.3.4-, 157.500 unidades por gramo de sólido, Sigma G-7141. Todos los reactivos fueron de grado analítico y no se utilizaron purificaciones adicionales. Para la preparación de soluciones se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18M\Omega cm$) obtenida de un sistema Millipore-MilliQ. Como electrolito soporte se utilizó “buffer” fosfato 0,050M pH 7,40.

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) fueron electrosintetizadas como se describió en el capítulo II.

2.2. Preparación del electrodo de trabajo

Como fue descrito en el capítulo II, CPE fue modificado con distintas proporciones de nanopartículas de Fe_3O_4 y/o GOx mezclando el polvo de grafito con el aceite mineral. Los compósitos conteniendo GOx fueron almacenados a 4 °C. Las medidas amperométricas fueron realizadas en solución "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40 en condiciones de convección forzada utilizando un agitador magnético, aplicando un potencial de trabajo de -0,100 V y esperando hasta que la corriente alcance el estado estacionario, previo a la adición del analito en la celda electroquímica. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

3. Resultados y discusión

3.1. Respuesta amperométrica de glucosa sobre CPE-GOx y CPE- Fe_3O_4 -GOx

Sobre la base de las propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas electrosintetizadas de Fe_3O_4 hacia la reducción de peróxido de hidrógeno ya descritas en el capítulo anterior y de las propiedades de biorreconocimiento de GOx, se desarrolló un biosensor amperométrico para glucosa a través de la detección sensible y selectiva del peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente, utilizando como transductor electroquímico CPE modificado con Fe_3O_4 . En el capítulo III se propuso como óptimo un contenido de 5,0 % P/P de Fe_3O_4 en CPE, ya que representó el mejor compromiso entre sensibilidad hacia peróxido de hidrógeno, pulido del electrodo y comportamiento resistivo, por lo que se empleó dicho compósito para el desarrollo del biosensor.

La **Figura 1A** muestra la respuesta amperométrica obtenida a -0,100 V para agregados sucesivos de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M (indicado con flechas) sobre CPE-GOx y CPE- Fe_3O_4 -GOx (en ambos compósitos el contenido de GOx es de 5,0 % P/P). Como puede observarse, la respuesta al analito sobre el compósito conteniendo sólo el

componente de biorreconocimiento es despreciable en ausencia de las nanopartículas. En cambio, sobre CPE- Fe_3O_4 -GOx la señal proveniente de la reducción del peróxido de hidrógeno enzimáticamente generado es importante, bien definida y rápida, alcanzando el estado estacionario dentro de los diez segundos de haber inyectado glucosa, debido a la actividad electrocatalítica de estas nanopartículas hacia la reducción del peróxido de hidrógeno. En la **Figura 1B** se muestra la correspondiente curva de calibración obtenida a partir de los registros amperométricos como el de la **Figura 1A** para la respuesta promedio de cinco superficies.

Como puede observarse, hasta una concentración de glucosa de $6,0 \times 10^{-3}$ M es posible obtener una relación lineal con la corriente estacionaria. A concentraciones mayores, si bien la corriente aumenta con la concentración de analito, no lo hace en forma lineal. Esto es, como en toda reacción biocatalítica debido a la saturación de la enzima por parte del sustrato. La sensibilidad obtenida fue $(32 \pm 1) \mu A.M^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0,996 y un límite de detección de $1,9 \times 10^{-4}$ M, calculado como tres veces el valor de la desviación estándar del ruido instrumental sobre la sensibilidad. El rango lineal obtenido con CPE- Fe_3O_4 -GOx fue de $6,0 \times 10^{-4}$ a $6,0 \times 10^{-3}$ M. De este modo, queda demostrado que la actividad electrocatalítica de Fe_3O_4 hacia la reducción de peróxido de hidrógeno discutida en el capítulo III puede ser explotada para el desarrollo de un biosensor de glucosa.

El valor de sensibilidad hallado para CPE- Fe_3O_4 -GOx es superior al biosensor propuesto por Hernandez y colaboradores [41] ($(10,8 \pm 0,2) \mu A.M^{-1}$). En este trabajo se presenta un biosensor construido a partir de la inmovilización de GOx sobre un soporte de nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas químicamente y cubiertas de un gel de sílica y propilamina. Por otro lado, al comparar la sensibilidad obtenida con CPE- Fe_3O_4 -GOx con el valor encontrado por Ozdemir y colaboradores, ésta es superior ($(83,7) \times 10^3 \mu A.M^{-1}$), pero es necesario tener en cuenta que el sobrepotencial de trabajo que se aplica para la determinación del peróxido de hidrógeno enzimáticamente generado es de -0,700 V [44]. En este biosensor, la superficie electródica de CPE fue modificada a partir de la inmovilización de nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas covalentemente con GOx a través de su superficie previamente

silanizada. El intervalo lineal obtenido por estos autores es más acotado (0,25 a 2,0 mM) que el encontrado con CPE- Fe_3O_4 -GOx.

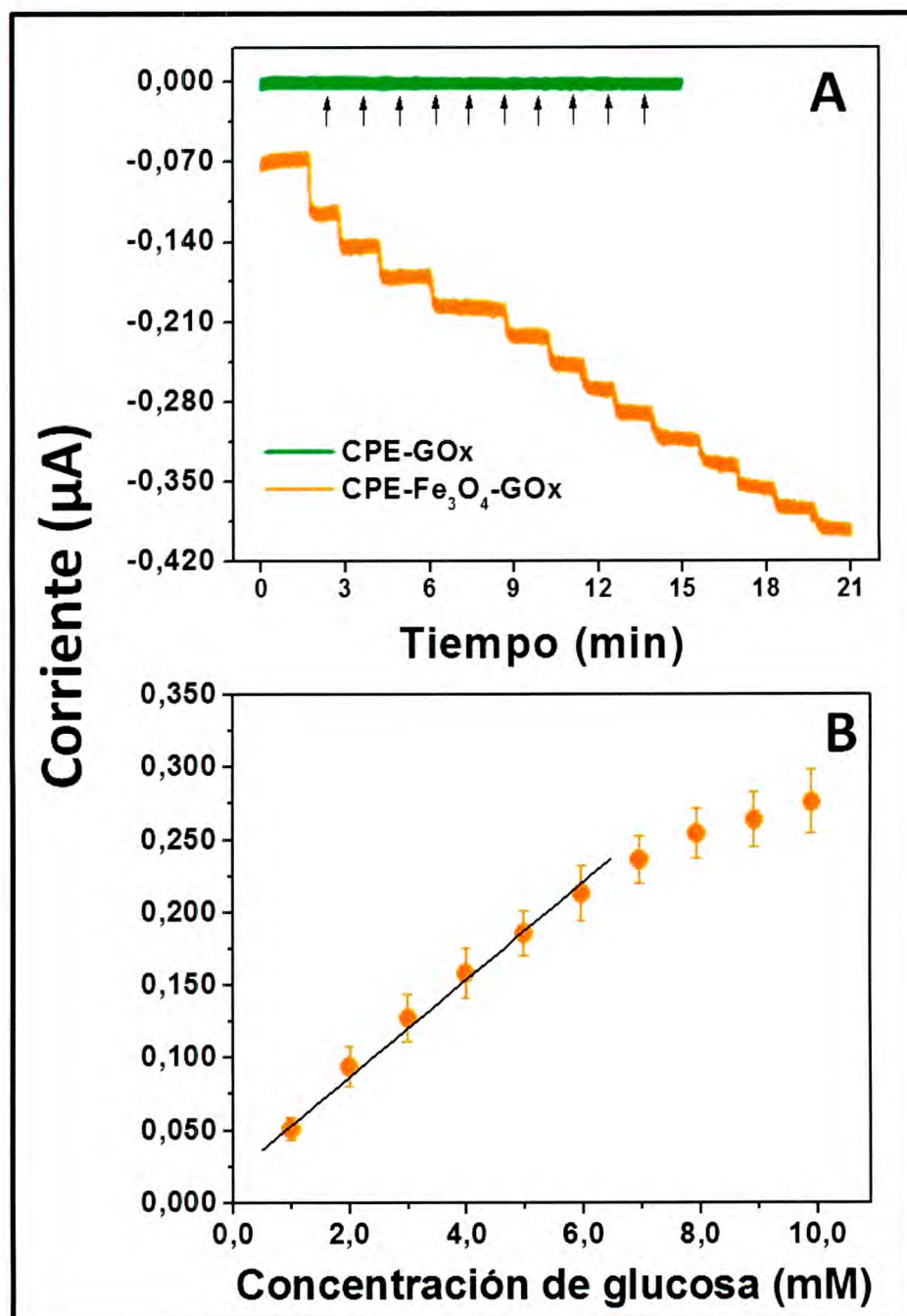


Figura 1. (A) Registros amperométricos obtenidos para agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M realizados a $-0,100$ V sobre diferentes compósitos de pasta de grafito conteniendo 5,0 % P/P de GOx (CPE-GOx) y 5,0 % P/P de Fe_3O_4 + 5,0 % P/P de GOx (CPE- Fe_3O_4 -GOx). **(B)** Curva de calibración para CPE- Fe_3O_4 -GOx obtenida a partir del promedio de cinco registros amperométricos. Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40.

Como se mencionó anteriormente el tiempo de respuesta del electrodo es muy importante desde el punto de vista de la posible aplicabilidad del biosensor. Con CPE- Fe_3O_4 -GOx, se alcanza el 90 % del valor de la corriente estacionaria a los 10 segundos de la inyección del analito en la celda. Este parámetro es significativamente inferior respecto a los 30 segundos obtenidos utilizando nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas covalentemente con GOx como es el caso de los bioelectrodos desarrollados por Ozdemir y colaboradores [44] y Rossi y colaboradores [47]. También, CPE- Fe_3O_4 -GOx demuestra mayor rapidez de respuesta respecto a las seis muestras por hora alcanzadas con el biorreactor en flujo propuesto por Hernandez, así como también una mayor sencillez en lo referido a la construcción del biosensor [41]. Se obtuvo un tiempo de respuesta al analito similar al valor hallado por Li y colaboradores con un electrodo compuesto de grafito desarrollado a partir de nanopartículas de Fe_3O_4 , azul de Prusia y GOx [45].

3.2. Efecto de la proporción de GOx en la respuesta a glucosa

Con el fin de seleccionar las mejores condiciones de trabajo, se analizó la influencia de la cantidad de GOx incorporada en el compuesto modificado con 5,0 % P/P de Fe_3O_4 en la respuesta del biosensor resultante. Se analizó la respuesta a glucosa a -0,100 V sobre CPE- Fe_3O_4 conteniendo 2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 % P/P de GOx. La **Figura 2** muestra la variación de la sensibilidad para curvas de calibración obtenidas de registros amperométricos a partir de agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M en función de la cantidad de GOx en el compuesto (trazo rojo, verde y azul respectivamente)

Como puede observarse, para todas las proporciones de GOx la mejor relación entre la corriente de reducción y concentración de sustrato es la obtenida a partir de los calibrados realizados con glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M. Esto es debido a que a concentraciones superiores de sustrato la saturación de la enzima comienza a ser importante. Es entonces que se generan menores aumentos en la velocidad de la

reacción biocatalítica ante el agregado del analito y consecuentemente menor sensibilidad del bioelectrodo.

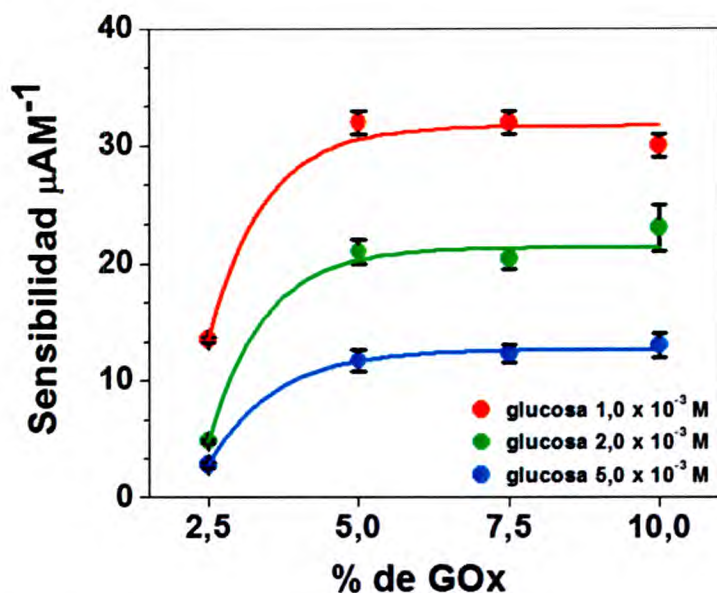


Figura 2. Variación de la sensibilidad obtenida a partir de registros amperométricos para agregados sucesivos de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$, $2,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M empleando CPE- Fe_3O_4 -GOx conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y cantidades variables de GOx. Otras condiciones como en la **Figura 1**.

Si bien la sensibilidad del bioelectrodo incrementa con el aumento de la proporción del biocatalizador incorporado en el compósito para los tres niveles de concentración de glucosa analizados, este aumento es mas marcado al comparar la sensibilidad obtenida con CPE- Fe_3O_4 conteniendo 5,0 % P/P de GOx respecto a la que contiene 2,5 % P/P de la enzima. Se observa que a partir de un contenido de GOx de 5,0 % P/P y para los tres niveles de concentración, la sensibilidad no cambia significativamente, tendiendo a un valor promedio de 31; 21,5 y 12,3 $\mu A M^{-1}$ para los calibrados realizados con agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. Este límite encontrado en cuanto a la cantidad de biocatalizador y la sensibilidad del biosensor puede ser explicado por una deficiencia en los niveles de oxígeno presente al incrementar la cantidad de GOx.

Se pone de manifiesto, entonces, a partir de los resultados presentados, que existe un límite en la relación enzima/nanopartícula. La incorporación de cantidades superiores a 5,0 % P/P de GOx en presencia de 5,0 % P/P de Fe_3O_4 no necesariamente es traducido en una mayor sinergia entre el nanomaterial electrocatalizador y la

enzima en relación a la sensibilidad a glucosa. Esto último guarda relación con lo descrito anteriormente (ver **Tabla 6** del capítulo IV) acerca del límite encontrado respecto al aumento de sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno en función de la proporción de GOx.

Se evaluó también la influencia de la cantidad de GOx frente a los demás parámetros analíticos del bioelectrodo a los fines de obtener la mejor “*performance*”. En la **Tabla 1** se muestran los parámetros analíticos obtenidos a partir de las curvas de calibración de los registros amperométricos a -0,100 V para agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con las distintas proporciones de GOx.

Como se describió anteriormente, para proporciones mayores que 5,0 % P/P de GOx la sensibilidad del bioelectrodo no cambia y el mejor límite de detección es el encontrado con esta cantidad de biocatalizador. Esto último es debido a que con los biosensores conteniendo 7,5 y 10,0 % P/P de enzima en su matriz compósita se observó un mayor ruido por la presencia de una mayor cantidad de material no conductor.

Compósito	Sensibilidad ($\mu\text{A M}^{-1}$)	Límite de detección (mM)	Intervalo lineal hasta (mM)	Coefficiente de correlación (r^2)	Repetitividad inter-superficie
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 2,5 % P/P	13,5 ± 0,5	0,44	8,0	0,996	6,4 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 5,0 % P/P	32 ± 1	0,19	6,0	0,996	6,9 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 7,5 % P/P	32 ± 1	0,28	6,0	0,997	6,5 %
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx 10,0 % P/P	30 ± 1	0,39	6,0	0,996	2,9 %

Tabla 1. Parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para agregados sucesivos de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con distintas proporciones de GOx. Otras condiciones como en la **Figura 1**.

Como puede observarse en la **Tabla 1**, la linealidad del bioelectrodo disminuye a $6,0 \times 10^{-3}$ M en presencia de cantidades mayores que 2,5 % P/P de GOx. Probablemente existe esta situación límite donde la linealidad de la respuesta a glucosa se encuentra comprometida debido a una deficiencia en la llegada a la

superficie electródica de oxígeno molecular desde el seno de la solución para regenerar la enzima. Esto se debería a que a partir de cantidades mayores que 2,5 % P/P de biocatalizador y a concentraciones superiores a la mencionada, la velocidad global del proceso sería gobernada por una deficiente regeneración del cofactor FAD, dada por la limitada difusión de oxígeno molecular hacia el sitio activo de la enzima.

La repetitividad inter-superficie calculada como la desviación estándar relativa de cinco calibrados realizados con el mismo compósito es muy buena para las cuatro proporciones de enzima. Al aumentar la proporción de proteína se presenta la misma tendencia observada respecto de los valores de repetitividad en la sensibilidad a peróxido de hidrógeno $2,0 \times 10^{-3}$ M; un mayor porcentaje de proteína propicia una distribución más homogénea no sólo de las nanopartículas electrocatalíticas sino que también del material conductor en el compósito (ver **Tabla 6** del capítulo IV).

Otro parámetro importante en relación a la aplicabilidad de un biosensor es la reproducibilidad inter-compósito. Para realizar este estudio se prepararon cinco compósitos diferentes conteniendo 5,0 % P/P de Fe_3O_4 y 5,0 % P/P de GOx y se analizó la respuesta amperométrica a -0,100 V para agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M. Se obtuvo un valor de reproducibilidad de 9,5%. Esto demuestra que la excelente repetitividad observada entre distintas superficies electródicas de un mismo electrodo se mantiene en la preparación de los compósitos.

Por lo antes discutido, el mejor compromiso entre todos los parámetros analíticos es el que presenta el compósito con 5,0 % P/P de enzima en su matriz. Es por esta razón que se la seleccionó como la proporción óptima para los subsiguientes estudios.

Los parámetros cinéticos del biosensor: K_M^{ap} y I_{max}^{ap} , se obtuvieron en condiciones de saturación del sistema, ya que de esta forma la velocidad global del proceso se encuentra bajo control enzimático. En la **Figura 3** se muestra el gráfico de Eadie-Hofstee obtenido a partir de cuatro curvas de calibración para glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE- Fe_3O_4 5,0 % P/P modificado con 5,0 % P/P de GOx. A partir de la porción lineal de los gráficos de la **Figura 3** se obtuvieron los parámetros cinéticos aparentes del bioelectrodo, los cuales se presentan en la **Tabla 2**.

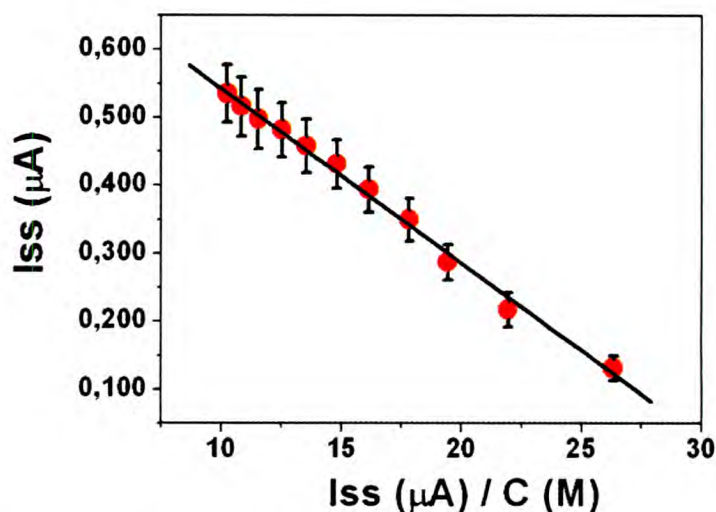


Figura 3. Gráfico de Eadie-Hofstee obtenido a partir de los datos de los experimentos amperométricos realizados para glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P modificado con 5,0 % P/P de GOx. Otras condiciones como en la Figura 1.

Compósito	K_m^{app} (mM)	I_{max} (µA)	Coefficiente de correlación (r^2)
CPE-Fe ₃ O ₄ -GOx	26 ± 1	$0,80 \pm 0,03$	0,997

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de los gráficos de Eadie-Hofstee de la Figura 5.

Sobre la base de los experimentos amperométricos, el comportamiento lineal dado por la saturación de la enzima no presenta desviación. Por otro lado el valor de K_M^{app} demuestra una excelente actividad biocatalítica de GOx frente a glucosa, ya que el valor reportado para la enzima en solución es entre 33 y 110×10^{-3} M [48, 49].

En este sentido, es necesario considerar el cambio conformacional que se produciría en la estructura de la enzima al interactuar con una superficie hidrofóbica de Fe₃O₄, directamente relacionado a su actividad biológica. Como se explicó anteriormente, son muchos los trabajos que afirman que la magnitud de este cambio estructural depende de la naturaleza físico-química del nanomaterial y la proteína, por ejemplo, aquellos nanomateriales con superficies hidrofóbicas o cargadas tienden a adsorber más a la moléculas proteicas y producir mayor grado de desnaturalización que aquellas con superficies neutras o hidrofílicas [50, 51]. Seehuber y Dahint

recientemente demostraron que la bioactividad de GOx adsorbida sobre nanopartículas de oro con diferentes revestimientos químicos es afectada directamente no sólo por la naturaleza química de la superficie del nanomaterial, sino también por su topografía y la orientación molecular que adopta la enzima inmovilizada [52]. Por otro lado el grado de curvatura del nanomaterial es crucial en este tipo de interacción; las proteínas adsorbidas sobre nanopartículas pequeñas tienden a sufrir menores cambios conformacionales que sobre superficies de menor curvatura [53, 54]. De todas formas, estos resultados dan indicio de que el microambiente donde está incluida la enzima dada por el grafito, el aceite mineral y las nanopartículas de Fe_3O_4 dispersas, no produciría un cambio significativo en la bioactividad.

3.3. Estudio de la selectividad en la respuesta del biosensor

Como ya se mencionó anteriormente, un aspecto muy importante en relación al desarrollo de biosensores amperométricos es la selectividad ante la presencia de compuestos fácilmente oxidables presentes en fluidos biológicos.

En el capítulo III se evaluó la interferencia de estos compuestos en función de la proporción de nanopartículas electrosintetizadas de Fe_3O_4 con el fin de optimizar una plataforma electroquímica sensible y selectiva a peróxido de hidrógeno y además capaz de ser utilizada como transductor electroquímico en biosensores amperométricos. En la **Figura 4** puede observarse la respuesta amperométrica registrada a -0,100 V ante la adición del analito e interferentes a la celda electroquímica. En la **Figura 4 A** se muestra el perfil amperométrico después de la adición de glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE- Fe_3O_4 -GOx. Esta concentración de glucosa en celda está dentro del intervalo fisiológico encontrado en suero sanguíneo de adultos sanos ($3,9$ - $6,1 \times 10^{-3}$ M).

En el caso de las **Figuras 4 B** y **C**, el experimento amperométrico consistió en una adición de glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M y a continuación cuatro adiciones consecutivas de AU $1,0 \times 10^{-4}$ M (**B**) o de AA $2,5 \times 10^{-5}$ M (**C**). La concentración total agregada de AU equivale a un valor cercano al límite superior fisiológico, siendo los valores normales

entre $2,14 \times 10^{-4}$ y $4,58 \times 10^{-4}$ M en hombres y $1,49 \times 10^{-4}$ y $4,04 \times 10^{-4}$ M en mujeres [55]. Para AA la concentración final alcanzada en la celda electroquímica corresponde al máximo encontrado en suero sanguíneo humano (valores normales de $0,5 \times 10^{-5}$ a $10,1 \times 10^{-5}$ M en ambos géneros) [56].

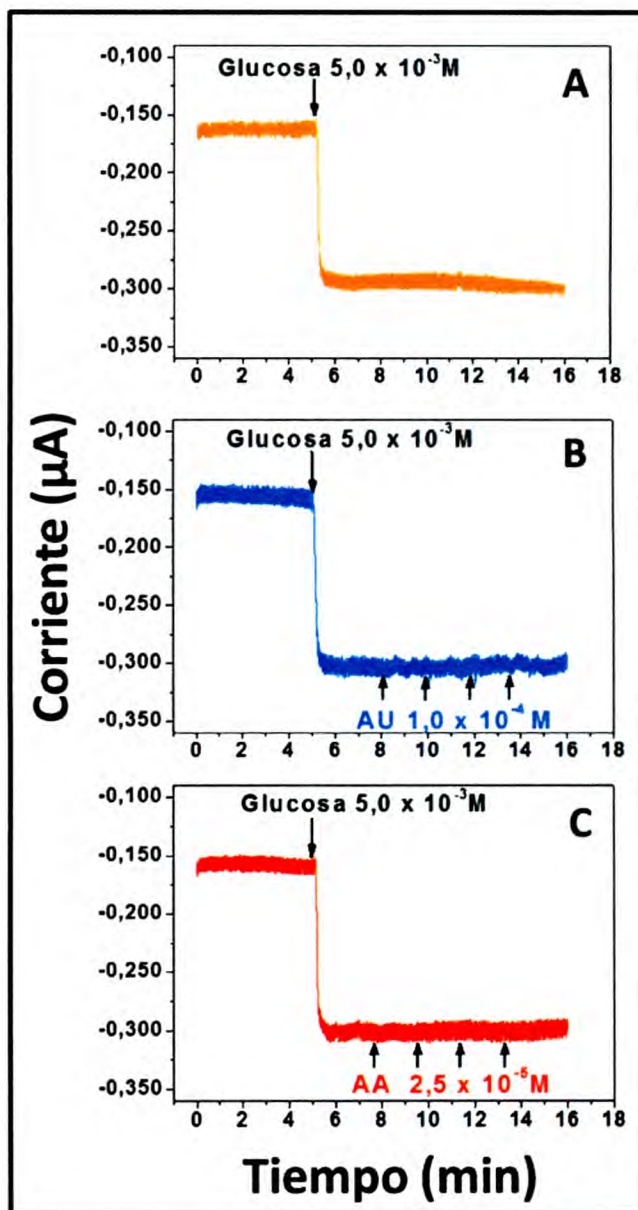


Figura 4. Registros amperométricos obtenidos sólo para un agregado de glucosa $5,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE- Fe_3O_4 -GOx (A) o seguido de agregados sucesivos de AU $1,0 \times 10^{-4}$ M (B) y AA $2,5 \times 10^{-5}$ M (C). Otras condiciones como en la Figura 1.

Se observa que en ambos casos no hay cambios en la corriente estacionaria obtenida luego de la adición de AA o AU a la celda, por lo que no existe interferencia

por parte de estos compuestos aún a niveles superiores a los fisiológicos. En este aspecto CPE- Fe_3O_4 -GOx presenta un mejor desempeño frente a los biosensores propuestos en las referencias [45] y [41] ya que para ambos casos existe una interferencia de 5% con AA. También en [41] se informa un hallazgo de interferencia por parte de AU y AU, causando una variación en la respuesta de $\pm 5\%$ en una solución conteniendo $4,0 \times 10^{-3}$ M de glucosa.

3.4. Estabilidad del biosensor

Se estudió la estabilidad de la respuesta de CPE- Fe_3O_4 -GOx a partir de estudios de repetitividad intra-superficie. El bioelectrodo fue desafiado con diez calibrados sucesivos sobre la misma superficie con agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M a $-0,100$ V. El valor encontrado de repetitividad fue de 5,4 %, calculado como el porcentaje de la desviación estándar relativa del promedio de la sensibilidad de los calibrados. Esta robustez para una misma superficie electródica tras distintos y numerosos ensayos, es muy importante a los fines de utilizar este novedoso material como biosensor de forma práctica y versátil.

Se evaluó la estabilidad del compósito en el electrodo, almacenando tanto a temperatura ambiente como en refrigerador a 4°C . Se examinó la evolución de la sensibilidad del bioelectrodo hacia glucosa a largo plazo, renovando la superficie en cada calibrado. Los ensayos fueron realizados dentro de un intervalo de 17 días. En la **Figura 5** se muestra la evolución de la sensibilidad respecto a la obtenida el día de elaboración del compósito en función del tiempo para ambas condiciones de almacenamiento. Tal como puede observarse, para el bioelectrodo almacenado a temperatura ambiente, la sensibilidad incrementa con el tiempo. Este aumento en la respuesta del electrodo muy probablemente está relacionado con un reordenamiento estructural de la enzima en el compósito.

En ambos casos la linealidad de los bioelectrodos disminuye a un valor de $4,0 \times 10^{-3}$ M a partir del día 6, a la vez que el ruido instrumental detectado aumenta con el tiempo, sobre todo con el compósito almacenado a temperatura ambiente. Esto

último se relaciona con la penetración de solvente en el compósito a lo largo de los ensayos, ya que como se mencionó anteriormente el biocompósito empaquetado dentro de la cavidad de Teflón no fue descartado, a diferencia de los estudios realizados previamente.

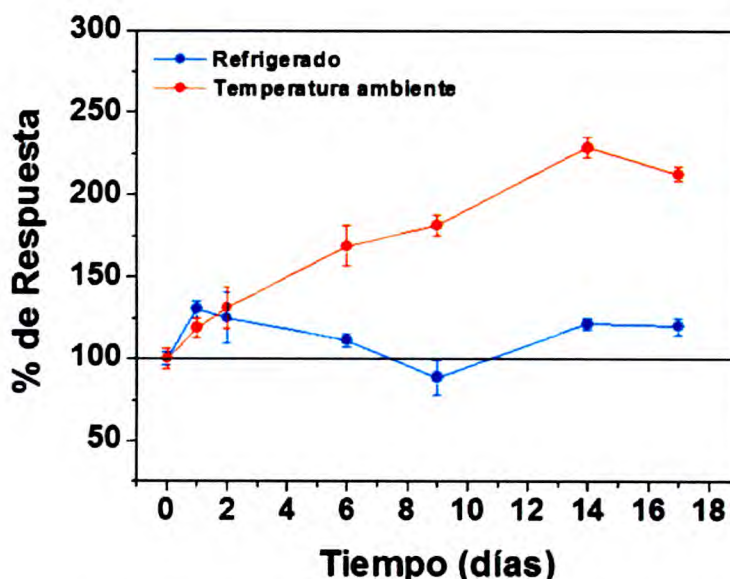


Figura 5. Estabilidad de la respuesta de CPE- Fe_3O_4 -GOx almacenado en el cuerpo del electrodo a temperatura ambiente y a 4 °C. Datos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M. Otras condiciones como en la **Figura 1**.

Por otro lado se determinó la respuesta amperométrica a glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre el mismo compósito pero esta vez almacenado en un recipiente cerrado por 10 meses a 4°C. El resultado fue que se mantuvo la sensibilidad en un 90 % respecto al día de fabricación del compósito. Éste hallazgo pone de manifiesto fehacientemente que bajo estas condiciones de almacenamiento el microambiente propiciado por el grafito, el aceite mineral y las nanopartículas electrosintetizadas de Fe_3O_4 preserva la bioactividad de GOx. La estabilidad obtenida con este biosensor es superior en relación al biosensor recientemente desarrollado por Baratella y colaboradores (60 días de vida media) [16]. Este fue construido a partir de CPE modificado con un líquido iónico y nanopartículas de γ - Fe_2O_3 (maghemita) funcionalizadas con GOx. Se observa también una mejor estabilidad de CPE- Fe_3O_4 -GOx en relación a las plataformas propuestas en las referencias [47], [49] y [52], ya que ninguno de estos biosensores superan los 90 días de estabilidad almacenados a 4°C.

3.5. Aplicación analítica del biosensor

El bioelectrodo fue empleado para determinaciones de glucosa en muestras de suero sanguíneo humano. Es importante destacar que en la respuesta de un biosensor amperométrico el “efecto matriz” de una muestra compleja como el suero sanguíneo suele ser un factor determinante en su “performance analítica”.

Se efectuaron estudios utilizando una muestra de suero (Standatrol S-E-2, Wiener Lab) conteniendo valores patológicos de diferentes bionalitos presentes en suero sanguíneo humano. Entre estos últimos se destacan AU y bilirrubina, ambos potenciales interferentes debido a que son electroactivos.

El resultado obtenido para cinco determinaciones de glucosa en suero Wiener fue de $(8,5 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M o (153 ± 2) mg/dL mientras que el laboratorio informó un valor de $8,6 \times 10^{-3}$ M o 155 mg/dL, obtenido por el método espectrofotométrico tradicional. De esta forma, se obtiene un error relativo de 1,2 % en comparación con el valor informado por el fabricante a partir del método estándar. Se demuestra un excelente desempeño y correlación para el biosensor amperométrico propuesto.

Estos resultados indican que CPE- Fe_3O_4 -GOx puede ser utilizado para cuantificar glucosa en muestras complejas como el suero sanguíneo humano, dada su gran selectividad y exactitud.

3.6. Comparación del desempeño analítico de CPE- Fe_3O_4 -GOx con un compósito de grafito conteniendo nanopartículas de Fe

Con fines comparativos, se estudió el efecto de la incorporación en los compósitos de grafito de nanopartículas aciculares de Fe de 100 nm de largo y 5 nm de radio axial. Sobre la base de la importante actividad electrocatalítica de estas nanopartículas de Fe hacia la reducción de peróxido de hidrógeno se incorporó 5,0 % P/P de GOx a CPE-Fe 5,0 % P/P y se evaluó su respuesta amperométrica para agregados de glucosa $1,0 \times 10^{-3}$ M a un potencial de trabajo de -0,100 V.

En la **Figura 6** se muestra la curva de calibración obtenida para CPE-Fe-GOx. La sensibilidad obtenida para este bioelectrodo fue de $(8,8 \pm 0,5) \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$. También se realizaron estudios de repetitividad e selectividad similares a los realizados para CPE-CPE-Fe₃O₄-GOx.

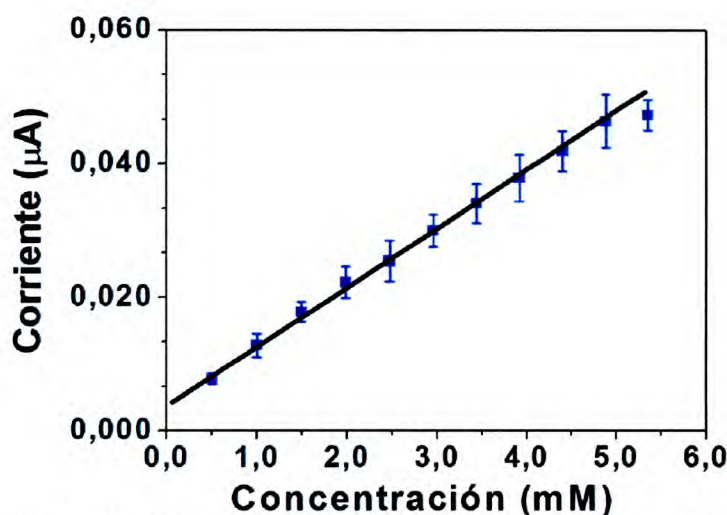


Figura 6 .Curva de calibración obtenida a partir del promedio de cinco registros amperométricos sobre CPE-Fe-GOx realizados a $-0,100$ V. Otras condiciones como en la **Figura 1**.

Con el propósito de comparar el desempeño analítico de CPE-Fe₃O₄-GOx en relación a CPE-Fe-GOx; en la **Tabla 3** se presentan los parámetros analíticos para ambos bioelectrodos.

Se observa que la sensibilidad a glucosa es 3,6 veces superior para CPE-Fe₃O₄-GOx respecto del biosensor conteniendo nanopartículas de Fe. En este sentido, es importante remarcar que aunque la sensibilidad a peróxido de hidrógeno sobre el transductor CPE-Fe 5,0 % P/P es superior a CPE-Fe₃O₄ 5,0 % P/P, ($(4,3 \pm 0,5)$ vs $(3,0 \pm 0,3) \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$ respectivamente), se observa que al incorporar 5,0 % P/P de GOx, este parámetro es incrementado a (20 ± 1) y $(85 \pm 3) \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$, respectivamente. Esto podría explicarse de acuerdo a lo discutido en el capítulo IV respecto al relativo poder dispersivo de una misma proteína entre nanopartículas de distinta naturaleza, el cual es traducido en un aumento de la respuesta electroquímica debido a una mayor exposición de la superficie electrocatalítica. En este aspecto, las nanopartículas de Fe₃O₄ se integrarían más fácilmente con GOx que las de Fe, permitiendo una mejor dispersión del material electrocatalítico en el compósito. Una vez más queda de

manifiesto que para obtener una eficiente dispersión de las nanopartículas en el compósito, no sólo es muy importante la relación de proporciones entre las mismas y el material proteico, sino que también lo es la naturaleza y tamaño de ambos componentes. Este efecto, explicaría en parte la mayor sensibilidad a glucosa observada sobre CPE- Fe_3O_4 -GOx.

Parámetro	Fe_3O_4	Fe
Sensibilidad	$(32 \pm 1) (\mu AM^{-1})$ ($r^2: 0,996$)	$(8,8 \pm 0,5) (\mu AM^{-1})$ ($r^2: 0,998$)
Intervalo lineal	$6,0 \times 10^{-4} - 6,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-4} - 5,0 \times 10^{-3} M$
Repetitividad intra-superficie	5,4 %	10,9 %
Repetitividad inter-superficie	6,9%	6,5 %
Reproducibilidad inter-compósito	9,5 %	9,5 %
Interferencia AA	0 % (0,100 mM)	0% (0,125 mM)
Interferencia AU	0% (0,400 mM)	8% (0,400 mM)
Estabilidad a 4 °C	A los 30 días mantiene 100 % de la actividad.	A los 30 días mantiene 91 % de la actividad.

Tabla 3. Parámetros analíticos obtenidos a partir de experimentos amperométricos realizados para glucosa sobre CPE-GOx 5,0 % P/P modificados con 5,0 % P/P de nanopartículas de Fe_3O_4 (20nm) y Fe (100nm). Otras condiciones como en la **Figura 1**.

Tanto la excelente repetitividad intra-superficie como la inter-superficie y la reproducibilidad inter-compósito, se mantienen en los biosensores conteniendo Fe. Sin embargo CPE- Fe_3O_4 -GOx demostró ser un bioelectrodo más robusto bajo estas condiciones.

En cuanto al estudio de la selectividad de CPE-Fe-GOx, se hicieron experimentos similares a los descritos en la sección 3.3 del presente capítulo. Para el bioelectrodo conteniendo Fe, se observa que existe una interferencia por parte de AU del 8% para

4,0 x 10⁻⁴ M respecto a la señal obtenida para una concentración de glucosa fisiológica (5,0 x 10⁻³ M). Por otro lado, en cuanto a los estudios de estabilidad, si bien en ambos casos la respuesta del bioelectrodo es muy buena, con CPE-Fe₃O₄-GOx la sensibilidad se mantiene en el 100% al cabo de 30 días.

Los valores de K_M^{ap} y I_{max}^{ap} obtenidos de los gráficos de Eadie-Hofstee a partir de la curvas de calibración para glucosa sobre CPE-Fe-GOx fueron (31 ± 2) mM y (0,35 ± 0,02) μA respectivamente. Esto demuestra que el proceso de inmovilización de la enzima en este compósito produce poca alteración de sus propiedades y que en concordancia con los valores de sensibilidad, la I_{max}^{ap} es menor en comparación a CPE-Fe₃O₄-GOx.

En la **Tabla 4** se indica el valor de glucosa obtenido con CPE-Fe-GOx para tres determinaciones con suero Wiener. Se encuentra una respuesta óptima al analito presente en la matriz biológica, demostrando una excelente selectividad, transformándolo en un biosensor potencialmente útil para la cuantificación de glucosa.

Valor informado por Wiener	Valor obtenido con CPE-Fe-GOx (N=3)	Error relativo
287 mg/dL	(30 ± 5) x 10 mg/dL	+ 4,5 %

Tabla 4. Determinación de glucosa en suero sanguíneo humano usando CPE-GOx 5,0 % P/P modificado con 5,0 % P/P de nanopartículas electrocatalíticas de Fe.

4. Conclusiones

La combinación de la gran especificidad de biorreconocimiento de GOx con las excelentes propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de Fe₃O₄ hacia la reducción del peróxido de hidrógeno permitió desarrollar un biosensor amperométrico para glucosa altamente selectivo, sensible, reproducible y estable.

La relación entre la cantidad de nanopartículas de Fe₃O₄ y de GOx presentes en el compósito demostró ser un parámetro clave en la respuesta del biosensor, siendo

5,0 % P/P de GOx y de 5,0 % P/P CPE- Fe_3O_4 las proporciones que posibilitaron lograr las mejores características analíticas.

Otro aspecto digno de destacar es que el entorno que brinda el compósito de grafito modificado con las nanopartículas de Fe_3O_4 resulta muy favorable, como se desprende de los parámetros cinéticos aparentes obtenidos.

El biosensor resultante pudo ser usado exitosamente para la cuantificación de glucosa en suero sanguíneo humano por lo que esta estrategia abre las puertas hacia nuevos desarrollos de biosensores electroquímicos basados en la utilización de enzimas oxidasas generadoras de peróxido de hidrógeno.

5. Bibliografía

- [1] "Diabetes," *Organización Mundial de la Salud*, pp. 312, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs3>, 2012.
- [2] J. Wang, "Electrochemical glucose biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 2, pp. 814–825, 2008.
- [3] A. Heller, B. Feldman, "Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management," *Chem. Rev.*, vol. 108, Nro. 7, pp. 2482–2505, 2008.
- [4] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, S. Yao, "Recent advances in electrochemical glucose biosensors," *RSC Adv.*, vol. 3, Nro. 14, pp. 4473–4491, 2013.
- [5] L. C. Clark, C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 102, pp. 29–45, 1962.
- [6] B. Unnikrishnan, S. Palanisamy, S.-M. Chen, "A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 39, Nro. 1, pp. 70–75, 2013.
- [7] M. Cui, B. Xu, C. Hu, H. B. Shao, L. Qu, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase on three-dimensional interpenetrating, porous graphene modified electrode," *Electrochim. Acta*, vol. 98, pp. 48–53, 2013.
- [8] B. Liang, L. Fang, G. Yang, Y. Hu, X. Guo, X. Ye, "Direct electron transfer glucose biosensor based on glucose oxidase self-assembled on electrochemically reduced carboxyl graphene," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 43, pp. 131–136, 2013.
- [9] V. Mani, B. Devadas, S.-M. Chen, "Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid

- material modified electrode for glucose biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 309–315, 2013.
- [10] Y. Wang, L. Liu, M. Li, S. Xu, F. Gao, "Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 30, Nro. 1, pp. 107–111, 2011.
- [11] P. Norouzi, F. Faridbod, B. Larijani, M. R. Ganjali, "Glucose biosensor based on MWCNTs-gold nanoparticles in a nafion film on the glassy carbon electrode using flow injection FFT continuous cyclic voltammetry," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 5, Nro. 9, pp. 1213–1224, 2010.
- [12] K. Zargoosh, M. J. Chaichi, M. Shamsipur, S. Hossienkhani, S. Asghari, M. Qandalee, "Highly sensitive glucose biosensor based on the effective immobilization of glucose oxidase/carbon-nanotube and gold nanoparticle in nafion film and peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new fluorophore," *Talanta*, vol. 93, pp. 37–43, 2012.
- [13] H. D. Jang, S. K. Kim, H. Chang, J.-W. Choi, J. Huang, "Synthesis of graphene based noble metal composites for glucose biosensor," *Mater. Lett.*, vol. 106, pp. 277–280, 2013.
- [14] H. Zhang, Z. Meng, Q. Wang, J. Zheng, "A novel glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase incorporated in biomediated gold nanoparticles-carbon nanotubes composite film," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 158, Nro. 1, pp. 23–27, 2011.
- [15] M. M. Rahman, A. J. S. Ahammad, J.-H. Jin, S. J. Ahn, J.-J. Lee, "A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides," *Sensors*, vol. 10, Nro. 5, pp. 4855–4886, 2010.
- [16] D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo, F. Vianello, "A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, pp. 13–8, 2013.
- [17] H.-F. Cui, K. Zhang, Y.-F. Zhang, Y.-L. Sun, J. Wang, W.-D. Zhang, J. H. T. Luong, "Immobilization of glucose oxidase into a nanoporous TiO₂ film layered on metallophthalocyanine modified vertically-aligned carbon nanotubes for efficient direct electron transfer," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 46, pp. 113–118, 2013.
- [18] L. Zhang, S.-M. Yuan, L.-M. Yang, Z. Fang, G.-C. Zhao, "An enzymatic glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with manganese dioxide nanowires," *Microchim. Acta*, vol. 180, Nro. 7–8, pp. 627–633, 2013.
- [19] M. Singh, S., McShane, "Role of porosity in tuning the response range of microsphere-based glucose sensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, Nro. 5, pp. 2478–2483, 2011.
- [20] J. Jung, H.Y., Park, J.H., Hwang, S., Kwak, "Synthesis of gold coated magnetic microparticles and their application for electrochemical glucose sensing by the enzymatically precipitated prussian blue," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 9, Nro. 5, pp. 901–906, 2013.

- [21] I. Willner, B. Willner, R. Tel-Vered, "Electroanalytical Applications of Metallic Nanoparticles and Supramolecular Nanostructures," *Electroanalysis*, vol. 23, Nro. 1, pp. 13–28, 2011.
- [22] N. German, A. Ramanavicius, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, "Glucose biosensor based on glucose oxidase and gold nanoparticles of different sizes covered by polypyrrole layer," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 413, pp. 224–230, 2012.
- [23] C. Xiang, Y. Zou, S. Qiu, L. Sun, F. Xu, H. Zhou, "BENZYMATIC glucose biosensor based on direct electrochemistry of cytochrome c on gold nanoparticles/polyaniline nanospheres composite," *Talanta*, vol. 110, pp. 96–100, 2013.
- [24] G.-Q. Wu, Z.-Y. Li, "Application of chitosan gold nanoparticles hybrid film biosensor in glucose measurement," *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.*, vol. 13, Nro. 29, pp. 5789–5792, 2009.
- [25] M. Kesik, F. E. Kanik, G. Hızalan, D. Kozanoglu, E. N. Esenturk, S. Timur, L. Toppare, "A functional immobilization matrix based on a conducting polymer and functionalized gold nanoparticles: Synthesis and its application as an amperometric glucose biosensor," *Polymer (Guildf.)*, vol. 54, Nro. 17, pp. 4463–4471, 2013.
- [26] Y.-Z. Zhao, K. Song, H.-Y., Chang, Z., Zhuang, S.-Q., He, P.-G., Fang, "Platinum (Pt) nanoparticles modified aligned carbon nanotubes (ACNTs) electrode was investigated. Pt nanoparticles which could enhance the electrocatalytic activity of the electrode for electrooxidating hydrogen peroxide produced with enzymatic reactions," *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical J. Chinese Univ.*, vol. 28, Nro. 7, pp. 1251–1254, 2007.
- [27] H. P. Liu, G. Y. Zhan, Q. Z. Dong, Y. A. Lv, J. F. Wang, C.-A. Tao, Z. H. Hu, "Glucose biosensor based on Pt nanoparticles/graphene-chitosan bionanocomposites," *Appl. Mech. Mater.*, vol. 328, pp. 695–699, 2013.
- [28] J. Li, R. Yuan, Y. Chai, X. Che, "Fabrication of a novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 66, Nro. 1–2, pp. 8–14, 2010.
- [29] L. Wang, X. Gao, L. Jin, Q. Wu, Z. Chen, X. Lin, "Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 176, pp. 9–14, 2013.
- [30] L. Chen, H. Xie, J. Li, "Electrochemical glucose biosensor based on silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes modified electrode," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 16, Nro. 10, pp. 3323–3329, 2012.
- [31] J.-M. You, S. Jeon, "A glassy carbon electrode modified with glucose oxidase and MWCNT-palladium nanoparticles for the determination of glucose," *Electroanalysis*, vol. 23, Nro. 9, pp. 2103–2108, 2011.

- [32] Y. Qin, Y. Kong, Y. Xu, F. Chu, Y. Tao, S. Li, "In situ synthesis of highly loaded and ultrafine Pd nanoparticles-decorated graphene oxide for glucose biosensor application," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, Nro. 47, pp. 24821–24826, 2012.
- [33] D. Pan, J. Chen, S. Yao, L. Nie, J. Xia, W. Tao, "Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at copper-modified gold electrode," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 104, Nro. 1, pp. 68–74, 2005.
- [34] H. Ai, X. Huang, Z. Zhu, J. Liu, Q. Chi, Y. Li, Z. Li, X. Ji, "A novel glucose sensor based on monodispersed Ni/Al layered double hydroxide and chitosan," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, Nro. 4, pp. 1048–1052, 2008.
- [35] P. Norouzi, H. Ganjali, B. Larijani, M. R. Ganjali, F. Faridbod, H. A. Zamani, "A glucose biosensor based on nanographene and ZnO nanoparticles using FFT continuous cyclic voltammetry," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 6, Nro. 11, pp. 5189–5199, 2011.
- [36] Y. Li, Y. Wei, G. Shi, Y. Xian, L. Jin, "Facile Synthesis of Leaf-Like CuO Nanoparticles and Their Application on Glucose Biosensor," *Electroanalysis*, vol. 23, Nro. 2, pp. 497–502, 2011.
- [37] S. Yao, J. Xu, Y. Wang, X. Chen, Y. Xu, S. Hu, "A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO_2 nanoparticles and dihexadecyl hydrogen phosphate composite film," *Anal. Chim. Acta*, vol. 557, Nro. 1–2, pp. 78–84, 2006.
- [38] J.-J. Xu, X.-L. Luo, Y. Du, H.-Y. Chen, "Application of MnO_2 nanoparticles as an eliminator of ascorbate interference to amperometric glucose biosensors," *Electrochem. commun.*, vol. 6, Nro. 11, pp. 1169–1173, 2004.
- [39] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, "Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, Nro. 9, pp. 577–583, 2007.
- [40] R. Krishna, S. Chandra, N. Bardhan, M. Salimian, Y. Y. Yang, E. Titus, J. Gracio, D. Bahadur, "Design of an amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase-arginated- Fe_3O_4 -glassy carbon electrode," *Sci. Adv. Mater.*, vol. 5, Nro. 4, pp. 333–340, 2013.
- [41] P. Hernandez, J. A. Rodriguez, C. A. Galan, Y. Castrillejo, E. Barrado, "Amperometric flow system for blood glucose determination using an immobilized enzyme magnetic reactor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 244–248, 2013.
- [42] H. Wei, E. Wang, " Fe_3O_4 Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H_2O_2 and Glucose Detection use of the novel properties of Fe_3O_4 MNPs as peroxidase," *Anal. Chem.*, vol. 80, Nro. 6, pp. 2250–2254, 2008.
- [43] H.-P. Peng, R.-P. Liang, L. Zhang, J.-D. Qiu, "Facile preparation of novel core-shell enzyme-Au-polydopamine- Fe_3O_4 magnetic bionanoparticles for glucosesensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 42, pp. 293–239, 2013.

- [44] C. Ozdemir, O. Akca, E. I. Medine, D. O. Demirkol, P. Unak, S. Timur, "Biosensing Applications of Modified Core-Shell Magnetic Nanoparticles," *Food Anal. Methods*, vol. 5, Nro. 4, pp. 731-736, 2011.
- [45] J. Li, X. Wei, Y. Yuan, "Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 139, Nro. 2, pp. 400-406, 2009.
- [46] P. E. Erden, B. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, E. Kiliç, "Amperometric carbon paste enzyme electrodes with Fe_3O_4 nanoparticles and 1,4-Benzoquinone for glucose determination," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 41, Nro. 3, pp. 165-171, 2013.
- [47] L. M. Rossi, A. D. Quach, Z. Rosenzweig, "Glucose oxidase - magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 380, Nro. 4, pp. 606-613, 2004.
- [48] B. E. P. Swoboda, V. Massey, "Oxidase from *Aspergillus niger* Purification and Properties of the Glucose," *J. Biol. Chem.*, vol. 240, pp. 2209-2215, 1965.
- [49] Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, V. Massey, "Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase of Action of Glucose," *J. Biol. Chem.*, vol. 239, pp. 3927-3934, 1964.
- [50] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, Nro. 7, pp. 2780-2799, 2012.
- [51] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh, V. F. Puntes, "Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe_3O_4 , CoO, CeO_2) nanoparticles," *Small*, vol. 7, Nro. 24, pp. 3479-3486, 2011.
- [52] A. Seehuber, R. Dahint, "Conformation and activity of glucose oxidase on homogeneously coated and nanostructured surfaces," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, Nro. 23, pp. 6980-6989, 2013.
- [53] A. A. Shemetov, I. Nabiev, A. Sukhanova, "Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 6, Nro. 6, pp. 4585-4602, 2012.
- [54] M. Mahmoudi, M. A. Shokrgozar, S. Sardari, M. K. Moghadam, H. Vali, S. Laurent, P. Stroeve, "Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 3, Nro. 3, pp. 1127-1138, 2011.
- [55] L. Kaplan, *Química Clínica. Teoría, análisis y correlación. Técnicas de laboratorio - Fisiopatología - Métodos de análisis*, 5th ed. Ohio, Estados Unidos: Panamericana S.A., 1991, p. 1497.
- [56] S. C. Rumsey, M. Levine, "Review Absorption , transport , disposition of ascorbic acid in humans," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 2863, Nro. 98, pp. 116-130, 1998.

*“Muchas personas están demasiado educadas para hablar con la boca llena,
pero no se preocupan por hacerlo con la cabeza hueca”.*

Orson Welles.

Capítulo VI

***Desarrollo de un sensor para dopamina
mediante la incorporación de grafeno
en un compósito de grafito***

1. Introducción

Dopamina (Do) se produce en diversas regiones del sistema nervioso, especialmente en la sustancia negra. Es uno de los neurotransmisores catecolaminérgicos más importantes del sistema nervioso central y está relacionada con la regulación de diversas funciones motoras, neuroendócrinas, motivacionales, cognitivas, así como con el consumo de drogas altamente adictivas como la cocaína, las anfetaminas y otros psicoestimulantes. En el sistema nervioso periférico, Do es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal. El déficit de este neurotransmisor está asociado a la enfermedad de Parkinson [1], en tanto que las personas que padecen esquizofrenia generalmente presentan un exceso en sus niveles [2]. Es por esto que el desarrollo de métodos sensibles y selectivos para determinar la concentración de Do y otros neurotransmisores en fluidos biológicos es uno de los retos analíticos actuales.

Los métodos electroquímicos de análisis han demostrado ser una opción adecuada debido a la rapidez y sencillez. Sin embargo, para la detección y cuantificación de biomoléculas, no sólo se requiere desarrollar plataformas sensibles y selectivas, sino que también deben ser reproducibles, económicas y robustas. Por otro lado, el mayor inconveniente para la determinación de Do por vía electroquímica es la interferencia por parte de especies fácilmente oxidables presentes en fluidos biológicos como AA y serotonina (Ser). En SNC estas tres especies coexisten en el líquido extracelular y sus potenciales de oxidación son muy cercanos. Esto último implica que la determinación electroquímica directa de Do sobre un electrodo no modificado deriva en una importante interferencia. Es por esto que en los últimos años se han planteado diversas estrategias electroquímicas para determinar Do de forma selectiva y sensible. Se han reportado sensores para cuantificar Do en presencia de estos interferentes utilizando polímeros como barrera selectiva para excluir interferentes o simplemente como soporte macromolecular para dispersar diversos nanomateriales [3–6]. Con el objetivo de resolver los potenciales de oxidación y obtener menores límites de detección, un esquema muy común ha sido la modificación de electrodos con nanotubos de carbono [7–9], surfactantes [10–12] y nanopartículas metálicas [13–15]

o también combinaciones de éstos. Sin embargo, estos materiales poseen ciertas desventajas en cuanto a su aplicación práctica y sencilla en biosensores electroquímicos. Por ejemplo, la obtención de nanopartículas metálicas de tamaño y uniformidad controlada es un proceso complejo. Por otro lado, la presencia de impurezas metálicas residuales electroactivas, provenientes de la síntesis de nanotubos de carbono puede influir en la respuesta electroquímica de los mismos como así también participar directamente en reacciones redox con moléculas biológicas [16].

Desde su descubrimiento en el año 2004 [17], el grafeno es un material que ha impactado en la electrónica, el almacenamiento y conversión de energía (baterías, supercapacitores, celdas de combustibles y solares) y en la biotecnología entre las disciplinas más destacadas [18]. Sus propiedades fisicoquímicas son únicas, se destacan su fortaleza y a la vez flexibilidad mecánica, actividad electrocatalítica, excelente, gran estabilidad térmica y área específica ($2830 \text{ m}^2/\text{g}$), y una alta conductividad eléctrica debido a sus enlaces π deslocalizados por encima y debajo de la lámina de átomos de carbono con hibridización sp^2 [18, 19]. Por otro lado, también es importante mencionar su biocompatibilidad, producción económica y simple, así como también la posibilidad de su funcionalización con biomoléculas [20]. Las propiedades que presenta este nanomaterial bidimensional hacen que su aplicación en el estudio y desarrollo de los (bio)sensores electroquímicos sea muy interesante para obtener mejores “*performances*” analíticas. En este sentido, se ha demostrado que a partir de la utilización de grafeno en la construcción de esos dispositivos es posible evitar las dificultades asociadas a los nanotubos y las nanopartículas metálicas [16, 21]. De esta forma, son numerosos los trabajos presentados que emplean grafeno en sensores electroquímicos tendientes a cuantificar diversos analitos como peróxido de hidrógeno [22, 23], AA [13, 24], NADH [25–27], glucosa [28, 29], colesterol [30], ADN [31–33], Do [13, 34–42], entre otras.

Las propiedades de los materiales carbonáceos para adsorber sustancias orgánicas son conocidas desde hace años. Son muchos los trabajos que han aprovechado la adsorción espontánea de catecolaminas sobre electrodos de carbono para detectarlas de forma sensible y selectiva [44, 45]. En este sentido, en el presente capítulo se

describe una atractiva metodología para el desarrollo de un sensor para la determinación sensible y selectiva de Do. Tal estrategia se basa en la aplicación de un novedoso material compuesto conteniendo grafeno como plataforma de electrodetección intentando, de este modo, explotar el efecto electrocatalítico del nanomaterial.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Se utilizó dopamina y serotonina obtenidas de Sigma. El ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio fueron obtenidos en Cicarelli. No se utilizaron purificaciones adicionales para ninguno de los reactivos. Para la preparación de soluciones se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18\text{M}\Omega\text{cm}$) obtenida de un sistema Millipore-MilliQ. Como electrolito soporte se utilizó "buffer" fosfato 0,050M pH 7,40.

La síntesis del óxido de grafeno (GrO) fue realizada a partir de grafito en polvo con el método de Hummers modificado [45]. El grafeno proveniente de la reducción química del GrO (R-GrO) fue obtenido por medio del tratamiento de las láminas de GrO con AA [46] como fue descrito en el capítulo II. Las diferentes etapas de la síntesis fueron evaluadas a través de espectroscopia FT-IR y Raman.

2.2. Instrumental

Como electrodo de trabajo se utilizaron los compósitos de pasta de carbono modificados con R-GrO (CPE-R-GrO) y sin modificar (CPE), empaquetados firmemente en una cavidad de Teflón de 3,0 mm de diámetro. La preparación de los electrodos de trabajo fue descrita en el capítulo II.

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato Epsilon (BAS). Los experimentos de voltamperometría cíclica (VC) se realizaron entre -0,200 V y

+0,800 V a 0,100 V/seg. La preconcentración de los analitos fue realizada bajo transporte convectivo utilizando un agitador magnético a potencial de circuito abierto y en “buffer” fosfato 0,050 M pH 7,40. Las condiciones experimentales para la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) fueron: escalón de potencial: 0,004V; ancho de pulso: 0,05 seg, período de pulso: 0,2 seg; amplitud de pulso: 0,050 V; velocidad de barrido 0,100 V/seg.

Los espectros FT-IR se obtuvieron con un espectrofotómetro Nicolet con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas mediante inmovilización de una gota de dispersión del material en etanol/agua (1:1).

Los espectros Raman del polvo de grafito, GrO y R-GrO fueron obtenidos usando un espectrómetro Horiba Jobin Yvon LabRam HR equipado con un laser de argón. Dichos espectros fueron colectados a 514,83 nm, utilizando una rendija de $100\ \mu\text{m}$ de ancho y acumulando 20 espectros registrados cada 10 seg.

Las imágenes de los compósitos fueron obtenidas con un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con un FE-SEM, Zeiss, modelo SIGMA.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de R-GrO y CPE-R-GrO

3.1.1. Caracterización espectroscópica de R-GrO

La **Figura 1** muestra los espectros FT-IR obtenidos en las distintas etapas de la síntesis de Gr a partir de grafito. Como se puede observar, en el espectro de GrO, se presentan las bandas correspondientes a las funciones oxigenadas, confirmando la oxidación del grafito. La banda ancha a 3400 cm^{-1} es asignada a la frecuencia de tensión de los enlaces O-H de las moléculas intercaladas de agua y de los grupos hidroxilos del GrO. La tensión del enlace C=O correspondiente a los grupos carbonilos y carboxilos se observa a 1730 cm^{-1} mientras que las del enlace C-O de los grupos epoxi y alcoxi se presentan a 1225 y 1050 cm^{-1} , respectivamente.

Los espectros de grafito y R-GrO obtenidos son similares entre ellos y coinciden con los reportados en bibliografía [47]. La banda de absorción ancha que se observa a 1550 cm^{-1} denota cierto grado de desorden, el cual puede relacionarse a la flexión de las láminas y a un cambio en la unión interplanar. Respecto a la absorción observada a 1640 cm^{-1} , la misma es asignada a la vibración C=C correspondiente a los dominios grafíticos no oxidados [48]. Ambos espectros difieren del obtenido con GrO principalmente debido a la importante disminución de la intensidad de las bandas a 3400 , 1730 y 1050 cm^{-1} . A pesar de la pequeña absorción a 1225 cm^{-1} que se presenta en el espectro de R-GrO, su intensidad decrece significativamente y su posición es desplazada en comparación con la banda similar observada en el caso de GrO. Estos resultados confirman que la mayoría de las funciones oxigenadas han sido removidas debido a la importante reducción de las láminas de GrO para generar R-GrO.

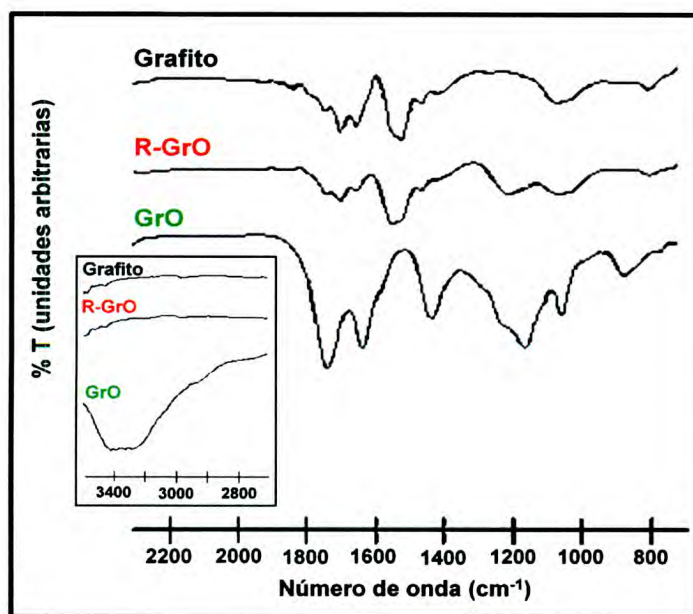


Figura 1. Espectros FT-IR para grafito, GrO y R-GrO.

En la **Figura 2** se muestran los espectros Raman para los materiales correspondientes a cada etapa de la síntesis realizada. Se presentan en negro el espectro correspondiente al polvo de grafito, en verde al GrO y en rojo al R-GrO. Como se puede observar, en el espectro de primer orden del grafito en polvo se presenta una

banda intensa G característica a 1550 cm^{-1} , ésta corresponde a la vibración fuera del plano por parte de los átomos de carbono hibridados sp^2 en la red bidimensional de anillos hexagonales. También se observa a 1340 cm^{-1} una banda D más débil, correspondiente al estiramiento dentro del plano en las terminaciones o bordes de las láminas del grafito. La intensidad de esta banda aumenta con la cantidad de defectos de borde. Las otras dos bandas del grafito corresponden al espectro de segundo orden; presentándose una intensa banda 2D a 2690 cm^{-1} y un hombro más débil a 1608 cm^{-1} (banda D').

El espectro de GrO presenta una banda G de menor intensidad y más ancha en comparación con la correspondiente al grafito, indicando un mayor desorden en las láminas. Además, se observa un importante incremento en la relación de intensidades entre las bandas D y G en relación a la obtenida con el grafito (desde 0,13 a 1,46), indicando la generación de átomos de carbono con hibridación sp^3 . Esto puede ser atribuido a la importante disminución en el tamaño promedio de los dominios de láminas de carbono sp^2 debido a la oxidación y exfoliación ultrasónica, y a la estructura gráfica cristalina parcialmente ordenada de las nanoplaquetas de láminas de grafeno resultantes. Por otro lado, respecto a la banda 2D, la misma es más ancha y posee una intensidad menor comparada con la banda G. Se observa un incremento en la intensidad de la señal de la banda D' y también aparece una banda a 2920 cm^{-1} (D + D'). El aumento de la relación de intensidades entre las bandas D y G en el espectro de GrO demuestra que se produce un gran desorden estructural en la red gráfica debido al proceso oxidativo [52, 53].

El espectro Raman del R-GrO muestra un importante aumento en la relación de intensidades entre las bandas D y G. Por otro lado se presenta una mayor definición de las bandas 2D y D+D' en comparación al espectro obtenido con GrO. Estos resultados indican que cuando las láminas de GrO son desoxigenadas a partir de la reducción química, la distorsión de los anillos hexagonales es eliminada, pero la red carbonácea gráfica es restituida parcialmente ya que persisten muchos defectos [50].

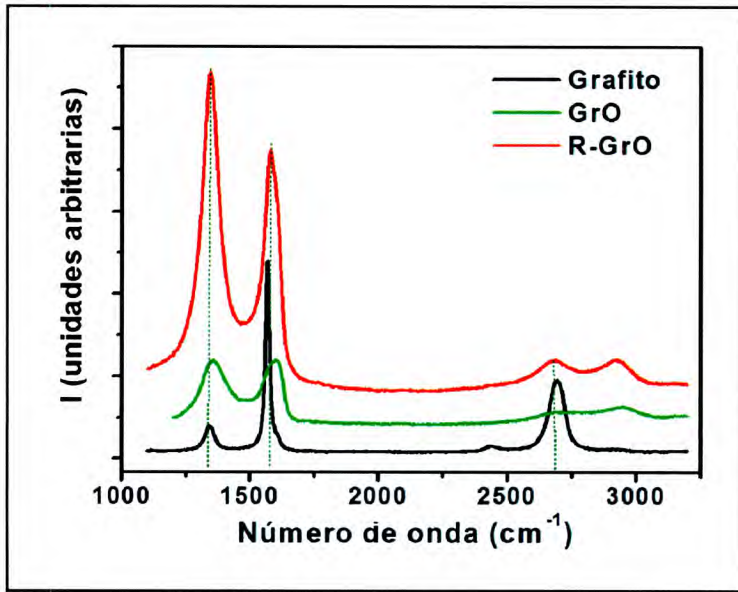


Figura 2. Espectros Raman para grafito, GrO y R-GrO.

3.1.2. Caracterización por microscopía electrónica de barrido de CPE-R-GrO

En la **Figura 3** se muestran las imágenes SEM para CPE (**A**), CPE conteniendo 50,0 % P/P (**B**) y 30,0 % P/P (**C**) de R-GrO en su matriz (CPE-R-GrO 50,0 % P/P y CPE-R-GrO 30,0 % P/P, respectivamente). Se puede observar en toda la superficie de CPE la aglomeración de dominios de las láminas gráficas planas. Cuando el compuesto carbonáceo está constituido en su totalidad por R-GrO, como es el caso CPE-R-GrO 50,0 % P/P, la estructura del mismo se torna globular y compacta, presentando muchas discontinuidades debido a regiones no fusionadas. También es posible observar una cantidad importante de bordes laminares expuestos, los cuales incrementan la rugosidad de la superficie. Como puede observarse para el caso de la mezcla en iguales proporciones de grafito y R-GrO, los dominios de las láminas gráficas cuasi-rectangulares y planas se observan en forma combinada con los glóbulos compactos de R-GrO. Dichas capas de grafito no cubren en su totalidad los dominios de R-GrO, exponiendo sus bordes.

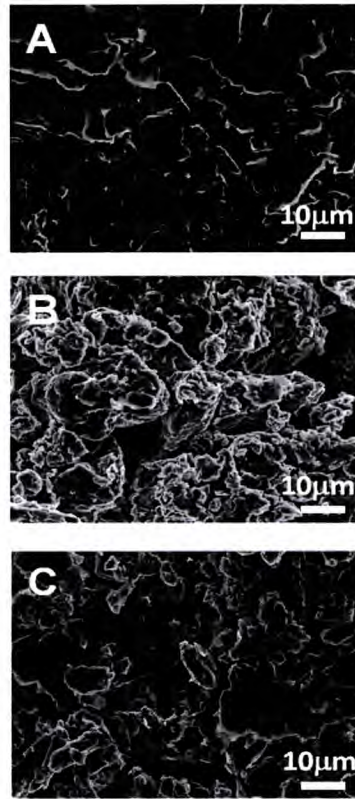


Figura 3. Imágenes obtenidas por SEM de CPE (A), CPE-R-GrO 50,0 % P/P (B) y CPE-R-GrO 30,0 % P/P (C). Magnificación: 10.000 x.

3.1.3. Comportamiento electroquímico de dopamina

En la **Figura 4** se compara la respuesta voltamperométrica de Do $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE, CPE-R-GrO 10,0 % P/P, CPE-R-GrO 30,0 % P/P y CPE-R-GrO 50,0 % P/P.

Se observa que sobre los compósitos conteniendo R-GrO en su matriz, la respuesta voltamperométrica de Do presenta una disminución de los sobrepotenciales de oxidación con el aumento de la proporción del nanomaterial. Esto indica la existencia de una transferencia de carga eficiente y facilitada aún sobre el compósito conteniendo 10,0 % P/P del nanomaterial. Puede observarse también que a este último efecto lo acompaña un importante aumento de las corrientes asociadas a dicho proceso.

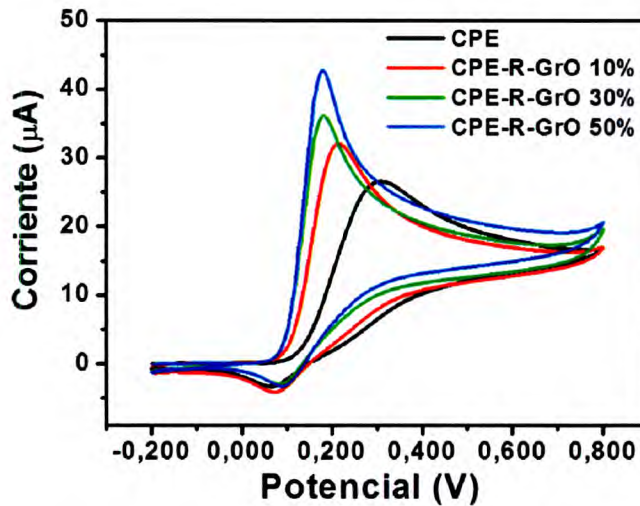


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos para Do $1,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos sobre CPE conteniendo 0,0; 10,0; 30,0 y 50,0 % P/P de R-GrO. Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40. Velocidad de barrido 0,100 V/s.

A partir de experimentos como los mostrados en la **Figura 4**, en la **Tabla 1** se resumen los parámetros voltamperométricos obtenidos para Do sobre los diferentes electrodos modificados con el nanomaterial. Sobre CPE modificado con R-GrO se observa una disminución importante en los valores de ΔE_p , indicando un comportamiento más reversible de Do sobre los electrodos modificados al aumentar la proporción de R-GrO en el compuesto. En efecto, ΔE_p disminuye 0,08; 0,12 y 0,13 V respecto del valor obtenido con CPE cuando R-GrO es incorporado al compuesto en una proporción de 10,0; 30,0 y 50,0 % P/P, respectivamente [40, 41, 45, 54, 55].

Esta mejora en la respuesta electroquímica es atribuida principalmente a la presencia de defectos y funcionalidades oxigenadas, sobre todo en los bordes de dichas estructuras nanolaminadas. Como se explicó en el capítulo I, muchos de estos defectos son mantenidos en la estructura de R-GrO ya que durante la reducción química del GrO, la restitución de la red hexagonal es parcial y dista mucho de la estructura perfecta del grafeno, constituida únicamente por átomos de carbono sp^2 . En este sentido, una alta densidad de estos defectos de borde oxigenados está fuertemente asociada a una rápida transferencia de carga. Son muchos los trabajos que atribuyen una mejor transferencia electrónica debido a la presencia de estos grupos electrocatalíticos en la respuesta electroquímica de las más diversas cuplas redox [20, 56, 57].

Compósito	$E_{p_{ox}}$ (V)	ΔE_p (V)	$I_{p_{ox}}$ (μA)
CPE	$0,28 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,04$	27 ± 1
CPE-Gr 10,0 % P/P	$0,210 \pm 0,005$	$0,132 \pm 0,007$	$28,3 \pm 0,3$
CPE-Gr 30,0 % P/P	$0,179 \pm 0,003$	$0,088 \pm 0,004$	33 ± 1
CPE-Gr 50,0 % P/P	$0,183 \pm 0,002$	$0,084 \pm 0,002$	36 ± 3

Tabla 1. Parámetros voltamperométricos para Do $1,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos sobre CPE conteniendo 0,0; 10,0; 30,0 y 50,0 % P/P de R-GrO a partir de los registros mostrados en la **Figura 4**.

Se puede observar que un aumento de la proporción de R-GrO en el compuesto en una proporción mayor que 30,0 % P/P no presenta una mejora adicional significativa en la respuesta hacia el analito. Por otra parte, el compuesto conteniendo 50,0 % P/P de R-GrO presenta una mayor dificultad para manipular y lograr superficies reproducibles en el proceso de pulido. De esta forma, CPE-R-GrO 30,0 % P/P representa el mejor compromiso entre respuesta electroquímica, repetitividad intersuperficie y maleabilidad.

3.2. Comportamiento voltamperométrico de AA y Ser sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P

Como ya se mencionó anteriormente, el principal inconveniente de la detección electroquímica de Do es la interferencia de especies electroactivas como AA y Ser. La misma es producida debido a que los sobrepotenciales de oxidación de estas biomoléculas sobre superficies electródicas carbonáceas son muy cercanos entre sí.

En la **Figura 5** se muestran los registros de las respuestas voltamperométricas para Do $1,0 \times 10^{-3}$ M, AA $1,0 \times 10^{-3}$ M y Ser $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P. Como puede observarse, con esta técnica voltamperométrica existe un solapamiento de las señales de electroxidación entre las tres especies, por lo que no sería posible determinar Do en presencia de AA y Ser debido a la cercanía de sus potenciales de

oxidación. Por lo tanto, es necesario desarrollar una metodología que permita una mejora en la resolución de la señal de oxidación de Do respecto de la voltamperometría cíclica en presencia de dichas especies electroactivas.

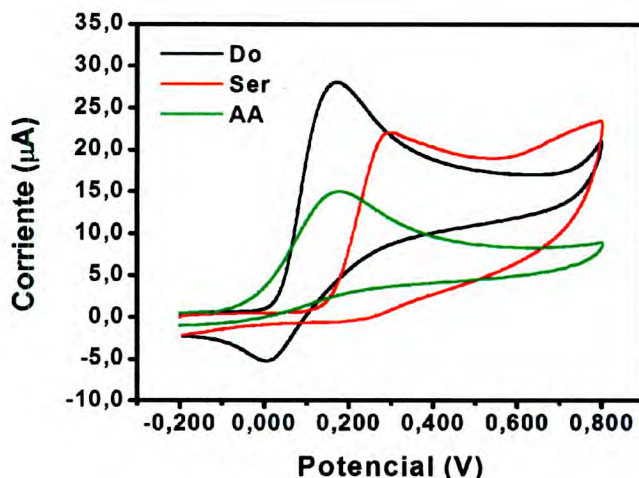


Figura 5. Voltamperogramas cíclicos para Do $1,0 \times 10^{-3}$ M, AA $1,0 \times 10^{-3}$ M y Ser $1,0 \times 10^{-3}$ M obtenidos sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P. Otras condiciones como en la Figura 4.

3.3. Aplicación analítica de CPE-R-GrO 30,0 % P/P

En la búsqueda de una nueva estrategia para determinar Do selectivamente, se analizó su adsorción sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P. Se contaba con la información preliminar que luego de realizar un registro por voltamperometría cíclica sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P en Do $1,0 \times 10^{-3}$ M y de un exhaustivo enjuague con cambio de medio (“buffer” fosfato), se obtenía un pico de corriente debido a la oxidación de Do sobre el electrodo

Sobre la base de esta evidencia, para determinar Do se desarrolló una metodología analítica basada en el análisis por “stripping” voltamperométrico adsorptivo (AdSV) con cambio de medio. En estas condiciones la determinación analítica propiamente dicha es realizada en una solución de “buffer” fosfato libre de analitos e interferentes con el objeto de minimizar el efecto matriz. Como se explicó en el capítulo II, esta estrategia se basa en la preconcentración selectiva del analito sobre el electrodo utilizando convección forzada para asegurar la llegada constante de masa a

la superficie del electrodo y la posterior electrooxidación de la Do acumulada superficialmente previo lavado exhaustivo de la superficie electródica mediante voltamperometría de pulso diferencial. Se realizó el estudio del efecto del tiempo de acumulación superficial a potencial de circuito abierto en la respuesta electroquímica de Do sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P empleando una solución del analito de $5,0 \times 10^{-6}$ M. En la **Figura 6A** se muestran los registros DPV, previa sustracción de la corriente de base realizadas a distintos tiempos de acumulación: 1,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 y 20,0 minutos. Se puede observar que la oxidación de la Do acumulada sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P ocurre a $(0,066 \pm 0,06)$ V. En la **Figura 6B** se grafican las corrientes de pico promedio obtenidas a partir de la electrooxidación del analito en función del tiempo de acumulación. Como puede observarse, la señal de oxidación de Do aumenta con el tiempo de preconcentración hasta los 15 minutos, alcanzando la saturación del sistema para tiempos mayores. Por lo tanto, para la posterior realización de la curva de calibración se seleccionó como tiempo óptimo 10 minutos, ya que representa el mejor compromiso entre la señal analítica obtenida y el tiempo de acumulación del analito.

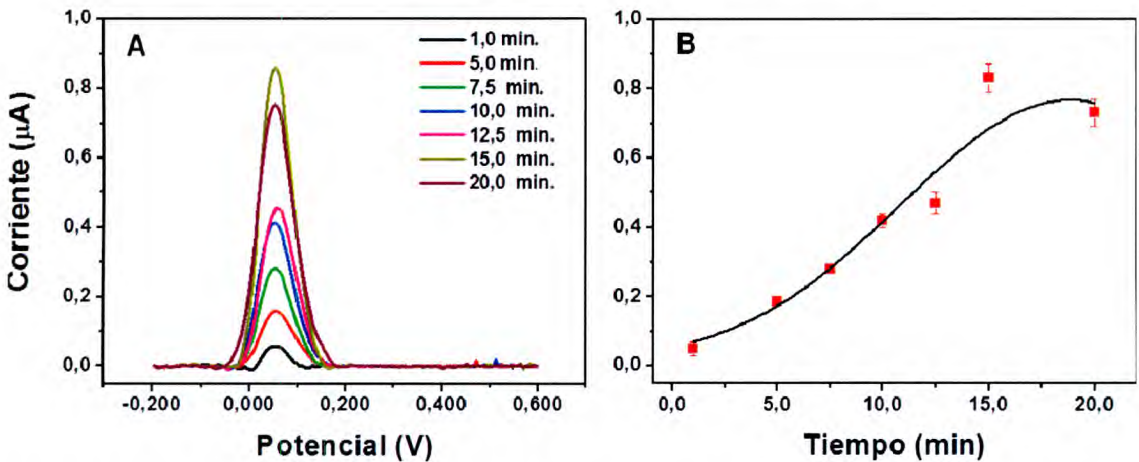


Figura 6.A DPV sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P con sustracción de la línea de base en "buffer" fosfato 0,050 M pH:7,4 luego de la acumulación durante diferentes tiempos a potencial de circuito abierto de Do $5,0 \times 10^{-6}$ M bajo convección forzada. **B** Corriente del pico de oxidación de Do en función del tiempo de adsorción. Electrolito soporte: "buffer" fosfato 0,050 M pH 7,40. Velocidad de barrido 0,100 V/s. Parámetros para DPV: escalón de potencial: 0,004V; ancho de pulso: 0,05 seg, periodo de pulso: 0,2 seg; amplitud de pulso: 0,050 V.

Una vez optimizado el tiempo de preconcentración se procedió a analizar los perfiles obtenidos con Do de distinta concentración. La **Figura 7A** muestra los registros obtenidos mediante DPV luego de la acumulación de Do sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P a potencial de circuito abierto en soluciones de distinta concentración. En la **Figura 7B** se muestra la curva de calibración correspondiente. Como se observa en la figura, en todo el intervalo de concentraciones de Do estudiado existe una relación lineal ($r^2=0,98$) con la señal proveniente de su electrooxidación. La sensibilidad hallada fue de $(43,0 \pm 0,3) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$ y el límite de detección de $4 \times 10^{-7} \text{ M}$, calculado como tres veces el valor de la desviación estándar del ruido instrumental sobre la sensibilidad ($3S_b/m$). Es importante destacar que el valor del límite de detección encontrado con CPE-R-GrO 30,0 % P/P es superior al obtenido por Colín-Orozco y colaboradores ($1,13 \times 10^{-6} \text{ M}$) utilizando también como plataforma de biodetección CPE [55].

Estos resultados demuestran que la incorporación de R-GrO en el electrodo compuesto permite la detección sensible de Do a partir de su preconcentración superficial en el electrodo.

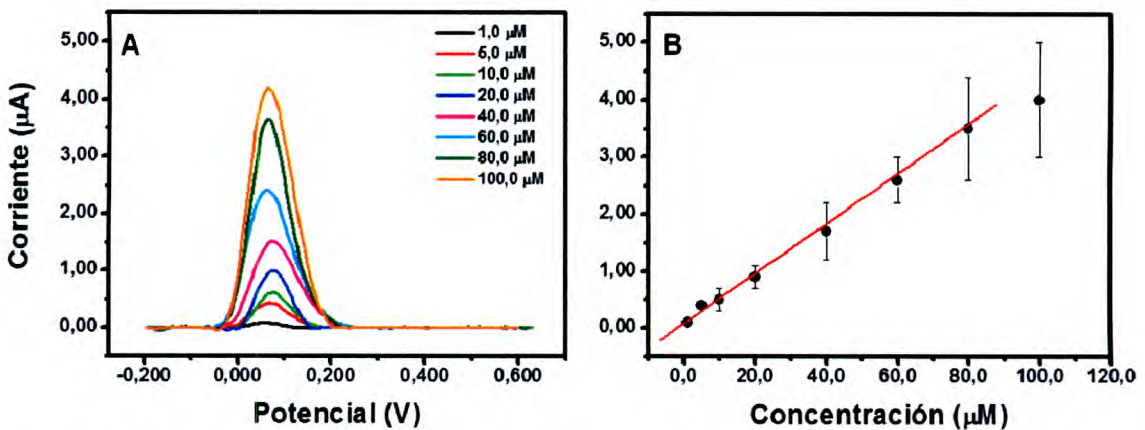


Figura 7.A DPV obtenida sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P en "buffer" fosfato 0,050 M pH:7,40 luego de la acumulación en solución de Do de concentración creciente. **B** Curva de calibración obtenida a partir del promedio de cinco determinaciones de la corriente del pico de oxidación de Do de los registros mostrados en 6.A. Tiempo de acumulación: 10 minutos. Otras condiciones como en la **Figura 6**.

A modo comparativo, en la **Tabla 2** se muestran los parámetros analíticos obtenidos con sensores electroquímicos basados en grafeno para la cuantificación de Do. Se desprende de la misma que CPE-R-GrO 30,0 % P/P presenta una mayor

sensibilidad respecto al sensor propuesto por Niu y sus colaboradores ($15,0 \pm 0,2$) $\times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$). Dicha plataforma fue desarrollada a través de la modificación de un electrodo de carbono vítreo (GCE) con un área geométrica similar a CPE-R-GrO 30,0 % P/P. La modificación fue realizada a partir de la deposición superficial de una película de grafeno sintetizado por el método de Hummers, nanotubos de carbono y un líquido iónico [39].

[Referencia]	Sensibilidad ($10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)	Intervalo lineal (μM)	RSD (%)	Interferencia	Electrodo
Este trabajo	43,0	0,4	1,1-100	7,7	Sin interferencia de AA y Ser	CPE
[39]	15,0	0,0012	0,03-3820	2,69	Sin interferencia de AA y AU	GCE
[42]	~ 50	2	2-200	3,2	Sin interferencia de AA Y AU	GCE
[40]	65,0	2,64	4-100	2,1	Sin interferencia de AA	GCE
[13]	390	5,4	10-800	4,0	Sin interferencia de AA , AU y triptofano	GCE
[41]	510	1,86	5-1000	4,0	Sin interferencia de AA	GCE
[34]	554	0,27	1-15	3,5	Sin interferencia de AA	GCE
[56]	650	0,5	2,5-100	< 3,0	Sin interferencia de AA y Epinefrina	GCE
[38]	975,7	0,6	4-520	-----	Sin interferencia de AA	CPE

Tabla 2. Comparación de los parámetros analíticos de CPE-R-GrO 30,0 % P/P con los informados por otros modificados con grafeno y sus derivados para la determinación de Do. LOD = $3S_b/m$.

En lo que respecta a la repetitividad, se encontró un valor relativamente aceptable en comparación con los trabajos mencionados en las referencias de la **Tabla 2**. Para el caso de CPE-R-GrO 30,0 % P/P ésta es expresada como la desviación estándar relativa (RSD) del promedio de la señal de electroxidación obtenida a partir de la acumulación de Do en una solución de concentración $1,00 \times 10^{-5}$ M para cinco superficies electródicas diferentes.

Como puede observarse en la **Tabla 2**, el límite de detección obtenido con el sensor propuesto en este trabajo, arrojó un valor menor o comparable en relación al encontrado con muchos de los sensores desarrollados a partir del empleo de grafeno y sus derivados. Es el caso del desarrollo de plataformas electrónicas a partir de grafeno sintetizado químicamente y luego dispersado en un solvente orgánico como la dimetilformamida ($2,64 \times 10^{-6}$ M) [40] o en agua bidestilada ($0,5 \times 10^{-6}$ M) [56], ambas dispersiones fueron utilizadas para modificar la superficie de GCE.

El límite de detección fue comparable al obtenido por Liu y colaboradores, que dispersaron el nanomaterial en aceite mineral para utilizarlo como compuesto de forma similar al que se propone en este trabajo ($0,6 \times 10^{-6}$ M) [38]. Por otro lado, el límite de detección obtenido con CPE-R-GrO 30,0 % P/P es más bajo que el obtenido al modificar GCEs utilizando grafeno para desarrollar nanocompuestos electrocatalíticos junto a otros materiales con interesantes propiedades. Es el caso por ejemplo de la modificación electrónica con *nanoclusters* de láminas de grafeno y TiO_2 a partir de una solución de isopropóxido de titanio ($2,0 \times 10^{-6}$ M) [42], como así también mediante la utilización de nanopartículas de Au ($1,86 \times 10^{-6}$ M) [41] y Ag ($5,4 \times 10^{-6}$ M) [13].

En lo referido al intervalo lineal, para CPE-R-GrO 30,0 % P/P es más amplio respecto al obtenido recientemente a partir de la modificación mediante inmovilización covalente de GrO ($1,0$ - $15,0 \times 10^{-6}$ M) [34]. También es importante mencionar que se obtuvo un valor similar de este parámetro en relación a los presentados en las referencias [40] ($4,0$ - $100,0 \times 10^{-6}$ M) y [56] ($2,5$ - $100,0 \times 10^{-6}$ M).

La selectividad de la determinación fue evaluada en mezclas conteniendo concentraciones elevadas de AA y Ser. Particularmente, AA es un compuesto que se encuentra en elevadas concentraciones en todo el SNC. En este medio fisiológico generalmente la concentración de AA es de 100 a 1000 veces superior respecto a la encontrada para Do.

La **Figura 8A** muestra los registros obtenidos mediante DPV sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P en "buffer fosfato" luego de la acumulación de Do $6,0 \times 10^{-5}$ M en ausencia (negro) y en presencia de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M (naranja). En verde se observa el registro obtenido en "buffer" luego de la acumulación en una solución conteniendo únicamente AA $1,00 \times 10^{-3}$ M. Como puede observarse en la **Figura 8A** no se registra

interferencia en la señal de electrooxidación de Do acumulada frente a la presencia de AA. Las corrientes obtenidas a partir de la oxidación del analito acumulado fueron $(2,6 \pm 0,4)$ y $(2,6 \pm 0,2)$ μA en presencia y en ausencia de AA, respectivamente.

Con el objetivo de conocer la selectividad del sensor a concentraciones mayores de AA se efectuaron experimentos similares en presencia de distinta concentración de este interferente. En la **Figura 8B** se muestran las corrientes promedio obtenidas por DPV para la acumulación en soluciones conteniendo Do $6,0 \times 10^{-5}$ M en función de la variación de la concentración de AA presente en la solución de preconcentración del analito. Las concentraciones estudiadas del interferente fueron 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 y $1,50 \times 10^{-3}$ M. La corriente de oxidación de Do no cambia, dentro de la variación estadística, aún para concentraciones elevadas de AA. El sensor muestra una muy buena selectividad frente a AA, ya que se determinó que la interferencia encontrada es nula por parte de esta especie en esos niveles. Es importante destacar que las concentraciones utilizadas en este estudio de interferencia son muy superiores a las encontradas en suero sanguíneo humano ($45-91 \times 10^{-6}$ M) [57] y en líquido cefalorraquídeo ($70-190 \times 10^{-6}$ M) [58] de individuos saludables.

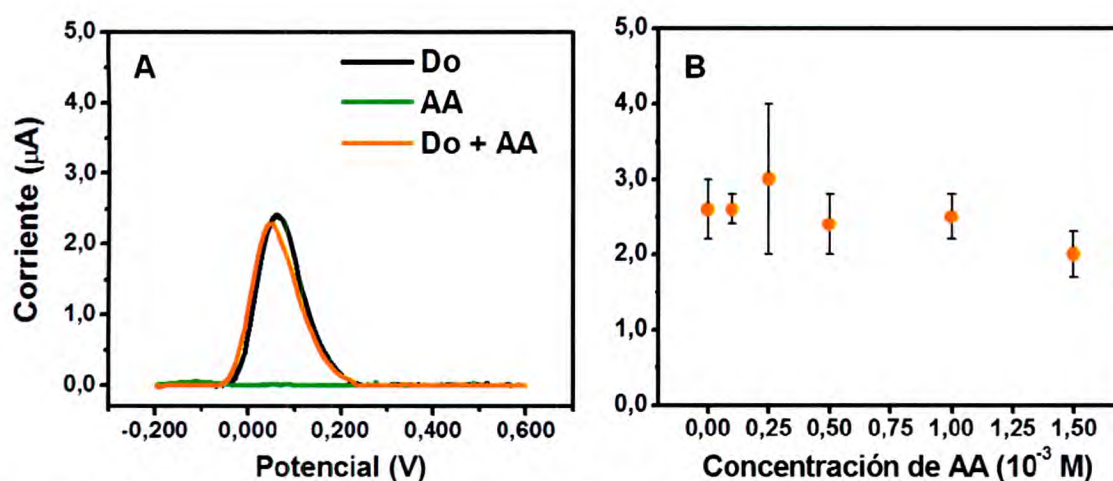


Figura 8A DPV sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P en "buffer" fosfato 0,050 M pH:7,40 luego de la acumulación en solución de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M o Do $6,0 \times 10^{-5}$ M en ausencia y en presencia de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M. **B** Corrientes del pico de oxidación de Do acumulada, obtenidas a partir del promedio de cinco determinaciones, en función de distintas concentraciones de AA a partir de los registros DPV como el mostrado en la **Figura 7A** Tiempo de acumulación: 10 minutos. Otras condiciones como en la **Figura 6**.

En la **Figura 9** se muestra la curva de calibración obtenida por "stripping" de adsorción de Do con cambio de medio empleando DPV sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P

en presencia de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M. Como puede observarse, hay una correlación lineal entre la concentración del analito y la corriente obtenida a partir de su electrooxidación. En este caso se obtuvo un valor de sensibilidad de $(43 \pm 3) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$, un coeficiente de correlación de 0,98 y un límite de detección de $4,0 \times 10^{-7}$ M. La sensibilidad encontrada es estadísticamente similar a la hallada en ausencia de AA, indicando que la plataforma desarrollada es óptima para llevar a cabo determinaciones de Do en presencia de altas concentraciones del interferente.

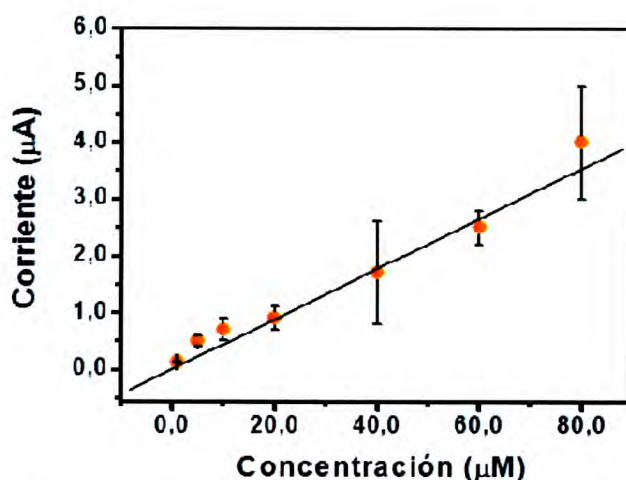


Figura 9. Curva de calibración obtenida a partir del promedio de cinco determinaciones de la corriente del pico de oxidación de Do de registros DPV sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P en "buffer" fosfato 0,050 M pH:7,40, luego de la acumulación en solución de concentración creciente de Do en presencia de AA $1,0 \times 10^{-3}$ M. Tiempo de acumulación: 10 minutos. Otras condiciones como en la **Figura 6**.

Como se mencionó anteriormente también se evaluó la respuesta de Ser frente a CPE-R-GrO 30,0 % P/P con el objetivo de evaluar la selectividad del sensor hacia Do en presencia de una alta concentración de dicho interferente realizando experimentos de "stripping" de adsorción empleando DPV con cambio de medio.

En la **Figura 10** se muestran los registros de voltamperometría de pulso diferencial sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P en "buffer fosfato" luego de la acumulación de Ser $2,0 \times 10^{-6}$ M (rojo) y Do $6,0 \times 10^{-6}$ M (negro). Como se muestra en el registro de trazo rojo, Ser es acumulada sobre la superficie eléctrica ya que se observó una señal de electrooxidación a $(0,207 \pm 0,08)$ V.

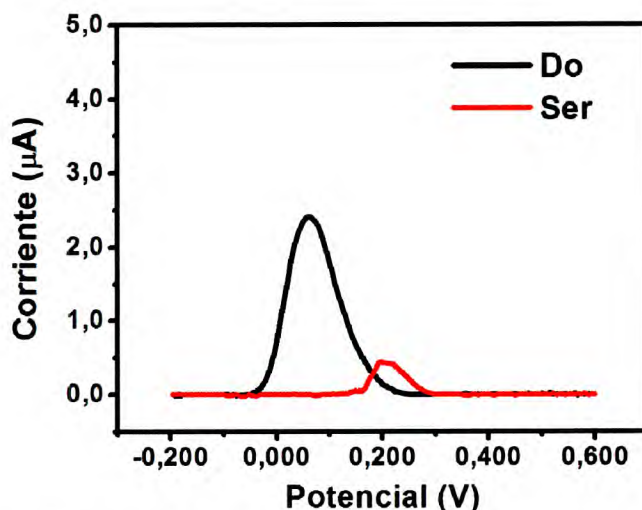


Figura 10. DPV sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P en "buffer" fosfato 0,050 M pH: 7,40 luego de la acumulación en solución de Do $6,00 \times 10^{-5}$ M o Ser $2,00 \times 10^{-6}$ M. Tiempo de acumulación:10 minutos. Otras condiciones como en la **Figura 6**.

Es importante destacar que la concentración fisiológica de Ser presente en fluidos biológicos como suero sanguíneo humano y líquido cefalorraquídeo es inferior al utilizado en el estudio mostrado en la **Figura 10**. Para suero sanguíneo los valores normales son entre $0,57$ y $1,61 \times 10^{-6}$ M [59] y para el caso del líquido cefalorraquídeo y tejidos nerviosos sus valores están entre $0,06$ y $5,67 \times 10^{-6}$ M [60, 61]. Teniendo en cuenta esto último, la respuesta del sensor fue evaluada en presencia de niveles fisiológicos de Ser y de un gran exceso de AA a partir de experimentos AdSV.

Los estudios por voltamperometría de pulso diferencial sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P en "buffer" luego de la acumulación de Do $6,0 \times 10^{-5}$ M en presencia de Ser $2,0 \times 10^{-6}$ M y AA $1,0 \times 10^{-3}$ M dan cuenta de la aparición de un único pico de oxidación a $(0,060 \pm 0,04)$ V atribuido a la oxidación de Do. En este sentido, a partir de la curva de calibración realizada en presencia de dichas concentraciones de interferentes, se obtuvo una sensibilidad de $(46 \pm 3) \times 10^3 \mu\text{A} \cdot \text{M}^{-1}$, un coeficiente de correlación de 0,98 y un límite de detección de $3,0 \times 10^{-7}$ M (datos no mostrados). Al comparar la sensibilidad hallada en presencia de concentraciones fisiológicas de Ser y exceso de AA, con los encontrados en ausencia de interferentes, es posible afirmar que CPE-R-GrO 30,0 % P/P presenta una excelente selectividad hacia Do.

Estos resultados demuestran que la combinación de las excelentes propiedades electrocatalíticas de R-GrO sobre la oxidación de Do junta a las ventajas de los electrodos compósito de grafito, como su versatilidad y bajo costo, permiten el desarrollo de un sensor altamente sensible y selectivo para dicho analito.

Por otro lado y sobre la base de los resultados mostrados en lo referido a la señal de oxidación debido a Ser acumulada sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P, surgiría la posibilidad de utilizar esta plataforma para la determinación de dicha especie por AdSV con cambio de medio. En este sentido, la **Figura 11A** muestra la respuesta voltamperométrica para Ser $1,0 \times 10^{-3}$ M sobre CPE y CPE-R-GrO 30,0 % P/P. Como puede observarse, cuando 30,0 % P/P de R-GrO se incorpora a CPE se presenta un pico de oxidación mejor definido, acompañado de una disminución del sobrepotencial y un aumento de la corriente de dicho proceso.

En la **Figura 11B** se muestra la dependencia de la corriente de pico de oxidación en función de la concentración de Ser luego de su acumulación sobre CPE-R-GrO 30,0 % P/P. Puede observarse un incremento lineal de la corriente en relación a la concentración de Ser desde $1,0 \times 10^{-6}$ a $20,0 \times 10^{-6}$ M y luego una saturación del sistema a concentraciones mayores. La sensibilidad obtenida fue de $(10 \pm 1) \times 10^4 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$, un coeficiente de correlación de 0,996, y un límite de detección de $1,5 \times 10^{-7}$ M.

Al comparar estos parámetros analíticos de CPE-R-GrO 30,0 % P/P frente a Ser con los encontrados por otros autores, puede observarse que el electrodo compósito modificado presenta una mejor sensibilidad que la obtenida por Njagi y colaboradores con un microelectrodos modificados con Nafión y nanotubos de carbono $((83,6) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1})$ [62]. Estos autores tienen como objeto determinar *in vivo* la liberación de Ser en el sistema digestivo de embriones de pez zebra. También se comprueba una mayor sensibilidad al analito por parte de CPE-R-GrO 30,0 % P/P al compararla con la encontrada con microsensores desarrollados a partir de un alambre de tungsteno $((28,5) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1})$ [63] o de fibras de carbono (aproximadamente $(1,65) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1})$ [64] recubiertos de nanotubos de carbono de pared simple. En este sentido, el trabajo propuesto por Alwarappan y colaboradores demostró que nanoláminas de grafeno sintetizadas por vía química, dispersadas en dimetilformamida

para luego inmovilizarlas sobre la superficie de GCEs presenta una sensibilidad de casi tres veces menor al valor obtenido con CPE-R-GrO 30,0 % P/P ($(38,6) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$). En este estudio, los autores comparan las propiedades electroanalíticas del grafeno y nanotubos de pared simple, llegando a la conclusión de que los electrodos modificados con el primero, son los que presentan el mejor desempeño [65].

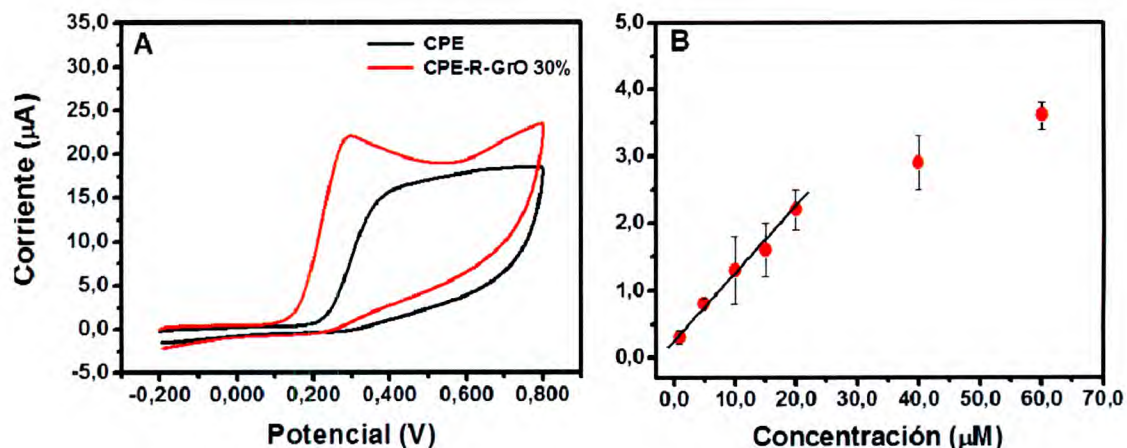


Figura 11.A Voltamperogramas cíclicos para Ser $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ obtenidos sobre CPE y CPE-R-GrO 30,0 % P/P. **B** Curva de calibración obtenida a partir del promedio de la corrientes de pico de oxidación de los registros de DPV sobre CPE-R-GrO 30,0% P/P para Ser acumulada en soluciones de diferente concentración. Tiempo de adsorción: 10 minutos. Otras condiciones como en la **Figura 6**.

De forma similar a la metodología de síntesis de R-GrO propuesta en este trabajo, recientemente Kim y colaboradores compararon tres medios diferentes de reducción del GrO frente al desempeño analítico de GCEs modificados con una suspensión acuosa del nanomaterial (entre $(474) \times 10^3$ y $(1411) \times 10^3 \mu\text{A}\cdot\text{M}^{-1}$) [66]. Aunque la sensibilidad encontrada para Ser con dichos sensores es superior a la hallada con CPE-R-GrO 30,0 % P/P, el método de reducción de GrO a partir de AA a temperatura ambiente resulta ser una opción más segura y ecológica que la utilización de hidracina y/o hidroxiamina propuesta por estos [66] y otros autores [65].

Si bien respecto a las referencias [62–70] los sensores muestran menores límites de detección (desde $1,0 \times 10^{-9}$ hasta $5,0 \times 10^{-8} \mu\text{M}$) y algunos presentan intervalos lineales bastante más amplios que al encontrado con CPE-R-GrO 30,0 % P/P, este sensor presenta como ventajas su simpleza, facilidad, accesibilidad de materiales y bajo costo de preparación. Es importante destacar también que no se encontraron en

bibliografía trabajos que combinen el poder electrocatalítico de R-GrO junto a los electrodos compósitos de grafito para determinar Ser por vía electroquímica. De esta forma se abrirían las puertas a nuevas posibilidades ante una novedosa y accesible alternativa para la detección de Ser.

4. Conclusiones

La incorporación de R-GrO en compósitos de carbono permite una notable mejora en la respuesta electroquímica de Do debido al efecto electrocatalítico del nanomaterial.

A partir de la selección de una proporción óptima del nanomaterial en el compósito de 30,0 % P/P y empleando la metodología de *stripping* voltamperométrico adsorbtivo, este novedoso material fue utilizado para su aplicación en determinaciones electroanalíticas de Do, permitiendo el desarrollo de una plataforma altamente sensible y selectiva en presencia de AA y Ser.

Estos resultados indican que CPE-R-GrO 30,0 % P/P es una alternativa sencilla, novedosa y accesible para la detección sensible de Do en presencia de altos niveles de interferentes electroactivos, representando una metodología mejoradora respecto de los nanotubos de carbono, ya que los costos de síntesis son notablemente menores y se evita el riesgo de contaminación con impurezas metálicas electroquímicamente activas provenientes de la síntesis de los mismos.

5. Bibliografía

- [1] S. Reyes, Y. D. Fu, K. L. Cottam, V. Thompson, L. H. Kirik, D. Paxinos, C. Watson, H. M. Cooper, G. M. Halliday, "Trophic factors differentiate dopamine neurons vulnerable to Parkinson's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 34, Nro. 3, pp. 873–886, 2013.
- [2] V. Bubeníková, H. Tejkalová, J. Klaschka, F. Šťastný, "The effect of elevated levels of dopamine on behaviour in young adult rats after neonatal administration of n-acetylaspartylglutamate," *Psychiatrie*, vol. 7, Nro. 3, pp. 46–49, 2003.

- [3] M. D. Rubianes, A. S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, G. Rivas, "Carbon nanotubes paste electrodes modified with a melanic polymer: Analytical applications for the sensitive and selective quantification of dopamine," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 144, Nro. 1, pp. 274–279, 2010.
- [4] Q. Chen, S. Ai, Q. Ma, H. Yin, "Selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using ferrocenyl-tethered PAMAM dendrimers modified glassy carbon electrode," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 40, Nro. 7, pp. 1379–1385, 2010.
- [5] X.-B. Li, G. R. Xu, R.-Y. Hu, "Selective determination of dopamine and uric acid at poly(acid red 176) modified glassy carbon electrode in the presence of ascorbic acid," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 8, Nro. 2, pp. 1920–1927, 2013.
- [6] X. Xu, Q. Lin, A. Liu, W. Chen, X. Weng, C. Wang, X. Lin, "Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polybromothymol blue film-modified glassy carbon electrode," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 58, Nro. 6, pp. 788–793, 2010.
- [7] X. Zhou, N. Zheng, S. Hou, X. Li, Z. Yuan, "Selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid at a multi-wall carbon nanotube-poly(3,5-dihydroxy benzoic acid) film modified electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 642, Nro. 1, pp. 30–34, 2010.
- [8] M. C. Rodríguez, M. D. Rubianes, G. A. Rivas, "Highly Selective Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid and Serotonin at Glassy Carbon Electrodes Modified with Carbon Nanotubes Dispersed in Polyethylenimine," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 8, Nro. 11, pp. 6003–6009, 2008.
- [9] T. Thomas, R. J. Mascarenhas, B. E. K. Swamy, P. Martis, Z. Mekhalif, B. S. Sherigara, "Multi-walled carbon nanotube/poly(glycine) modified carbon paste electrode for the determination of dopamine in biological fluids and pharmaceuticals," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 110, Nro. 1, pp. 458–465, 2013.
- [10] T. V. Sathisha, B. E. Kumara Swamy, B. N. Chandrashekar, N. Thomas, B. Eswarappa, "Selective determination of dopamine in presence of ascorbic acid and uric acid at hydroxy double salt/surfactant film modified carbon paste electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 674, Nro. 3, pp. 57–64, 2012.
- [11] B. N. Shankar, S.S. Swamy, B.E.K. Chandrashekar, "A simple and selective method for the determination of dopamine (DA) using Iso-ctyl phenoxy polyethoxy ethanol (TX-100) modified carbon paste electrode," *J. Mol. Liq.*, vol. 168, pp. 80–86, 2012.
- [12] S. S. Shankar, B. E. K. Swamy, B. N. Chandrashekar, "Electrochemical selective determination of dopamine at TX-100 modified carbon paste electrode: A voltammetric study," *J. Mol. Liq.*, vol. 168, pp. 80–86, 2012.
- [13] B. Kaur, T. Pandiyan, B. Satpati, R. Srivastava, "Simultaneous and sensitive determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, tryptophan with silver nanoparticles-decorated reduced graphene oxide modified electrode," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 111C, pp. 97–106, 2013.

- [14] C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, F. Hu, M. Zhang, "Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized-polyimidazole composite modified glassy carbon electrode," *Anal. Chim. Acta*, vol. 741, pp. 15–20, 2012.
- [15] Y. Oztekin, M. Tok, E. Bilici, L. Mikoliunaite, Z. Yazicigil, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, "Copper nanoparticle modified carbon electrode for determination of dopamine," *Electrochim. Acta*, vol. 76, pp. 201–207, 2012.
- [16] M. Pumera, "Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage," *Chem. Rec.*, vol. 9, Nro. 4, pp. 211–223, 2009.
- [17] K. S. Novoselov, K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, A. A. Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films," *Science (80-.)*, vol. 306, Nro. 5696, pp. 666–669, 2004.
- [18] O. V. Prezhdo, "Graphene — The ultimate surface material," *Surf. Sci.*, vol. 605, Nro. 17–18, pp. 1607–1610, 2011.
- [19] X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey, H. Zhang, "Graphene-based materials: synthesis, characterization, properties, applications," *Small*, vol. 7, Nro. 14, pp. 1876–1902, 2011.
- [20] Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, Y. Lin, "Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review," *Electroanalysis*, vol. 22, Nro. 10, pp. 1027–1036, 2010.
- [21] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, J. H. Lee, "Recent advances in graphene-based biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, Nro. 12, pp. 4637–4648, 2011.
- [22] L. Xie, Y. Xu, X. Cao, "Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized at graphene, flower-like zinc oxide, gold nanoparticles nanocomposite modified glassy carbon electrode," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 107, Nro. 1, pp. 245–250, 2013.
- [23] M. Liu, R. Liu, W. Chen, "Graphene wrapped Cu₂O nanocubes: Non-enzymatic electrochemical sensors for the detection of glucose and hydrogen peroxide with enhanced stability," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, Nro. 1, pp. 206–212, 2013.
- [24] F. Li, J. Li, Y. Feng, L. Yang, Z. Du, "Electrochemical behavior of graphene doped carbon paste electrode and its application for sensitive determination of ascorbic acid," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 157, Nro. 1, pp. 110–114, 2011.
- [25] K. Guo, K. Qian, S. Zhang, J. Kong, C. Yu, B. Liu, "Bio-electrocatalysis of NADH and ethanol based on graphene sheets modified electrodes," *Talanta*, vol. 85, Nro. 2, pp. 1174–1179, 2011.

- [26] Z. Li, Y. Huang, L. Chen, X. Qin, Z. Huang, Y. Zhou, Y. Meng, J. Li, S. Huang, Y. Liu, W. Wang, Q. Xie, S. Yao, "Amperometric biosensor for NADH and ethanol based on electroreduced graphene oxide-polythionine nanocomposite film," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 181, pp. 280–287, 2013.
- [27] A. Gasnier, M. L. Pedano, M. D. Rubianes, G. A. Rivas, "Graphene paste electrode: Electrochemical behavior and analytical applications for the quantification of NADH," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 176, pp. 921–926, 2013.
- [28] H. P. Liu, G. Y. Zhan, Q. Z. Dong, Y. A. Lv, J. F. Wang, C.-A. Tao, Z. H. Hu, "Glucose biosensor based on Pt nanoparticles/graphene-chitosan bionanocomposites," *Appl. Mech. Mater.*, vol. 328, pp. 695–699, 2013.
- [29] Y.-Q. Zhang, Y.-J. Fan, L. Cheng, L.-L. Fan, Z.-Y. Wang, J.-P. Zhong, L.-N. Wu, X.-C. Shen, Z.-J. Shi, "A novel glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer assembly film of copper phthalocyanine functionalized graphene," *Electrochim. Acta*, vol. 104, Nro. 1, pp. 178–184, 2013.
- [30] M. Zhang, R. Yuan, Y. Chai, C. Wang, X. Wu, "Cerium oxide-graphene as the matrix for cholesterol sensor," *Anal. Biochem.*, vol. 436, Nro. 2, pp. 69–74, 2013.
- [31] D. Du, S. Guo, L. Tang, Y. Ning, Q. Yao, G.-J. Zhang, "Graphene-modified electrode for DNA detection via PNA-DNA hybridization," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, pp. 563–570, 2013.
- [32] Y. Bo, W. Wang, J. Qi, S. Huang, "A DNA biosensor based on graphene paste electrode modified with Prussian blue and chitosan," *Analyst*, vol. 136, Nro. 9, pp. 1946–1951, 2011.
- [33] S. Guo, D. Du, L. Tang, Y. Ning, Q. Yao, G.-J. Zhang, "PNA-assembled graphene oxide for sensitive and selective detection of DNA," *Analyst*, vol. 138, Nro. 11, pp. 3216–3220, 2013.
- [34] F. Gao, X. Cai, X. Wang, C. Gao, S. Liu, F. Gao, Q. Wang, "Highly sensitive and selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at graphene oxide modified electrode," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, pp. 380–387, 2013.
- [35] S.-J. Li, J.-Z. He, M.-J. Zhang, R.-X. Zhang, X.-L. Lv, S.-H. Li, H. Pang, "Electrochemical detection of dopamine using water-soluble sulfonated graphene," *Electrochim. Acta*, vol. 102, pp. 58–65, 2013.
- [36] Y. Zeng, Y. Zhou, L. Kong, T. Zhou, G. Shi, "A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, Nro. 1, pp. 25–33, 2013.
- [37] J. Yu, Y. Chen, Z. Zhang, B. Li, X. Pan, "Selective and sensitive determination of uric acid in the presence of ascorbic acid and dopamine by PDDA functionalized graphene/graphite composite electrode," *Talanta*, vol. 112, pp. 31–36, 2013.

- [38] S.-Q. Liu, W.-H. Sun, F.-T. Hu, "Graphene nano sheet-fabricated electrochemical sensor for the determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using cetyltrimethylammonium bromide as the discriminating agent," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 173, pp. 497–504, 2012.
- [39] X. Niu, W. Yang, H. Guo, J. Ren, J. Gao, "Highly sensitive and selective dopamine biosensor based on 3,4,9,10-perylene tetracarboxylic acid functionalized graphene sheets/multi-wall carbon nanotubes/ionic liquid composite film modified electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 41, pp. 225–231, 2013.
- [40] Y.-R. Kim, S. Bong, Y.-J. Kang, Y. Yang, R. K. Mahajan, J. S. Kim, H. Kim, "Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, Nro. 10, pp. 2366–2369, 2010.
- [41] J. Li, J. Yang, Z. Yang, Y. Li, S. Yu, Q. Xu, X. Hu, "Graphene–Au nanoparticles nanocomposite film for selective electrochemical determination of dopamine," *Anal. Methods*, vol. 4, Nro. 6, pp. 1725–1728, 2012.
- [42] Y. Fan, H.-T. Lu, J.-H. Liu, C.-P. Yang, Q.-S. Jing, Y.-X. Zhang, X.-K. Yang, K.-J. Huang, "Hydrothermal preparation and electrochemical sensing properties of TiO₂-graphene nanocomposite," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 83, Nro. 1, pp. 78–82, 2011.
- [43] B. D. Bath, D. J. Michael, B. J. Trafton, J. D. Joseph, P. L. Runnels, R. M. Wightman, "Subsecond Adsorption and Desorption of Dopamine at Carbon-Fiber Microelectrodes," *Anal. Chem.*, vol. 72, Nro. 24, pp. 5994–6002, 2000.
- [44] R. E. Vasquez, "Voltametric studies on the adsorption and electrode reaction of dopamine at electrochemically pretreated glassy carbon electrodes," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 14, pp. 389–403, 1992.
- [45] R. Willams Hummers, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, p. 1339, 1958.
- [46] S. G. J. Zhang, H. Yang, G. Shen, P. Cheng, J. Zhang, "Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid," *Chem. Commun.*, vol. 46, pp. 1112–1114, 2010.
- [47] J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso, J. M. D. Tascón, "Graphene oxide dispersions in organic solvents," *Langmuir ACS J. surfaces colloids*, vol. 24, Nro. 19, pp. 10560–10564, 2008.
- [48] J. Shen, N. Li, M. Shi, Y. Hu, M. Ye, "Covalent synthesis of organophilic chemically functionalized graphene sheets," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 348, Nro. 2, pp. 3773–383, 2010.
- [49] S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, "Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide," *Carbon N. Y.*, vol. 45, Nro. 7, pp. 1558–1565, 2007.

- [50] J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, P. Solís-Fernandez, A. Martínez-Alonso, J. M. D. Tascón, "Atomic force and scanning tunneling microscopy imaging of graphene nanosheets derived from graphite oxide," *Langmuir*, vol. 25, pp. 5957–5968, 2009.
- [51] M. Pumera, "Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, Nro. 11, pp. 4146–4157, 2010.
- [52] Z.-H. Sheng, X.-Q. Zheng, J.-Y. Xu, W.-J. Bao, F.-B. Wang, X.-H. Xia, "Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 34, Nro. 1, pp. 125–131, 2012.
- [53] K. R. Ratinac, W. Yang, J. J. Gooding, P. Thordarson, F. Braet, "Graphene and Related Materials in Electrochemical Sensing," *Electroanalysis*, vol. 23, Nro. 4, pp. 803–826, 2011.
- [54] M. Pumera, "Graphene in biosensing," *Mater. Today*, vol. 14, Nro. 7–8, pp. 308–315, 2011.
- [55] E. Colín-Orozco, S. Corona-Avenidaño, M. T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, "On the Electrochemical Oxidation of Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid onto a Bare Carbon Paste Electrode from a 0,1 M NaCl Aqueous Solution at pH 7," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 7, pp. 6097–6105, 2012.
- [56] X. Ma, M. Chao, Z. Wang, "Electrochemical detection of dopamine in the presence of epinephrine, uric acid and ascorbic acid using a graphene-modified electrode," *Anal. Methods*, vol. 4, Nro. 6, p. 1687, 2012.
- [57] D. S. Goldstein and C. Holmes, "Neuronal source of plasma dopamine," *Clin. Chem.*, vol. 54, Nro. 11, pp. 1864–1871, 2008.
- [58] C. M. Tallaksen, T. Bøhmer, H. Bell, "Concentrations of the water-soluble vitamins thiamin, ascorbic acid, folic acid in serum and cerebrospinal fluid of healthy individuals," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, Nro. 3, pp. 559–564, 1992.
- [59] M. Salwen, H. Siddiqi, F. Gress, W. Bowne, "Laboratory diagnosis of gastrointestinal and pancreatic disorders," in *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Philadelphia, USA: Elsevier Saunders, 2011.
- [60] N. Xu, C. Qiu, W. Wang, Y. Wang, C. Chai, Y. Yan, D. Zhu, "HPLC/MS/MS for quantification of two types of neurotransmitters in rat brain and application: Myocardial ischemia and protection of Sheng-Mai-San," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 55, pp. 101–108, 2011.
- [61] J. Wagner, P. Vitali, M. G. Palfreyman, M. Zraika, "Simultaneous Determination of 3,4-Dihydroxyphenylalanine, 5-Hydroxytryptophan, Dopamine, 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylalanine, Norepinephrine, 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid, Homovanillic Acid, Serotonin, 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Rat Cerebrospinal Fl," *J. Neurochem.*, vol. 38, pp. 1241–1254, 1982.

- [62] J. Njagi, M. Ball, M. Best, K. N. Wallace, S. Andreescu, "Electrochemical quantification of serotonin in the live embryonic zebrafish intestine," *Anal. Chem.*, vol. 82, Nro. 5, pp. 1822–1830, 2010.
- [63] F. Valentini, S. Orlanducci, E. Tamburri, M. L. Terranova, A. Curulli, G. Palleschi, "Single-Walled Carbon Nanotubes on Tungsten Wires: A New Class of Microelectrochemical Sensors," *Electroanalysis*, vol. 17, Nro. 1, pp. 28–37, 2005.
- [64] B. E. K. Swamy, B. J. Venton, "Carbon nanotube-modified microelectrodes for simultaneous detection of dopamine and serotonin in vivo," *Analyst*, vol. 132, Nro. 9, pp. 876–884, 2007.
- [65] S. Alwarappan, A. Erdem, C. Liu, C.-Z. Li, "Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, Nro. 20, pp. 8853–8857, 2009.
- [66] S. K. Kim, D. Kim, S. Jeon, "Electrochemical determination of serotonin on glassy carbon electrode modified with various graphene nanomaterials," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 174, pp. 285–291, 2012.
- [67] X. Yang, B. Feng, X. He, F. Li, Y. Ding, J. Fei, "Carbon nanomaterial based electrochemical sensors for biogenic amines," *Microchim. Acta*, vol. 180, Nro. 11–12, pp. 935–956, 2013.
- [68] Y. Sun, J. Fei, J. Hou, Q. Zhang, Y. Liu, B. Hu, "Simultaneous determination of dopamine and serotonin using a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified glassy carbon electrode," *Microchim. Acta*, vol. 165, Nro. 3–4, pp. 373–379, 2009.
- [69] F. Wang, Y. Wu, K. Lu, B. Ye, "A simple but highly sensitive and selective calixarene-based voltammetric sensor for serotonin," *Electrochim. Acta*, vol. 87, pp. 756–762, 2013.
- [70] P. Yáñez-sedeño, L. Agüí, J. M. Pingarrón, "Carbon Nanotubes-Based Microelectrode (Bio)sensors," *Microelectrode Biosens.*, vol. 80, pp. 281–294, 2013.



“Es un milagro que la curiosidad sobreviva a los sistemas formales de educación”.

Albert Einstein.

Capítulo VII

Conclusiones generales

Conclusiones generales

En este trabajo de tesis se desarrollaron sensores electroquímicos basados en el empleo de compósitos de grafito modificados con nanopartículas electrogeneradas de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4) o grafeno (CPE-R-GrO), dirigidos a la cuantificación de bioanalitos de gran relevancia clínica como peróxido de hidrógeno, glucosa y dopamina.

Las excelentes propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de Fe_3O_4 incorporadas en el compósito posibilitaron una notable disminución de los sobrepotenciales para la reducción de peróxido de hidrógeno y un gran incremento de las corrientes asociadas. Tomando ventajas de esta importante actividad catalítica de las nanopartículas de Fe_3O_4 , se logró la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno a muy bajos potenciales (-0,100 V) con la consecuente mejora en la sensibilidad y selectividad, desafíos de gran actualidad en el desarrollo de nuevas plataformas analíticas para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y analitos relacionados metabólicamente.

La incorporación conjunta de distintas proteínas (insulina, GOx, ovolisozima, mucina, albúmina y caseína) y de Fe_3O_4 en el compósito de grafito permitió obtener una drástica mejora en la reducción de peróxido de hidrógeno debido al sinergismo producido por el aumento considerable de la superficie electrocatalítica expuesta producido por una más eficiente dispersión de las nanopartículas. El efecto sinérgico entre Fe_3O_4 y la proteína, que se tradujo en una significativa disminución de la R_{tc} , en un marcado incremento de la sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno y en una mayor repetitividad en la respuesta amperométrica, fue altamente dependiente de la relación entre las proporciones de Fe_3O_4 y proteína.

La naturaleza de la proteína incorporada en el compósito demostró ser un aspecto fundamental en el poder dispersivo de las nanopartículas electrocatalíticas, siendo la respuesta obtenida una combinación de diversas contribuciones entre las que se cuenta la densidad de residuos hidrofóbicos de la proteína, su tamaño y su estructura tridimensional. Los resultados obtenidos a partir de estudios realizados con diferentes

proteínas demostraron que el mejor desempeño analítico se obtuvo a partir de la modificación de CPE-Fe₃O₄ con Alb.

A partir de la plataforma optimizada de CPE-Fe₃O₄ y su combinación con GOx (CPE-Fe₃O₄-GOx) se desarrolló un biosensor amperométrico para glucosa sensible, selectivo, reproducible, estable y rápido, demostrando que el compósito modificado con Fe₃O₄ proporciona a la enzima un microambiente óptimo que hace posible no sólo una eficiente inmovilización, sino también una muy buena actividad biocatalítica.

El biosensor desarrollado presentó excelente selectividad hacia glucosa, aún en gran exceso de AA y AU, permitiendo su empleo para la detección directa de glucosa en suero sanguíneo humano con una excelente correlación con la técnica enzimático-espectrofotométrica estándar empleada habitualmente en la bioquímica clínica.

Otro aspecto abordado en este trabajo de tesis fue el estudio de un nuevo material compósito para el desarrollo de sensores electroquímicos basados en la incorporación de R-GrO sintetizado a partir de la oxidación química de grafito y la reducción de GrO con AA. Los sensores resultantes presentaron una importante mejora en la respuesta electroquímica de Do debido al efecto electrocatalítico de R-GrO y a la eficiente adsorción del neurotransmisor en el electrodo compósito. A partir de la utilización de la metodología de *stripping* voltamperométrico adsorptivo con cambio de medio asociada con voltamperometría de pulso diferencial, se logró la determinación de Do a niveles submicromolares aún en presencia de un exceso de AA y de serotonina. De este modo, la modificación de CPE con R-GrO representa una alternativa novedosa para la cuantificación electroquímica sensible y selectiva de Do, mucho más simple y práctica y menos costosa que las obtenidas empleando nanotubos de carbono.

A modo de corolario final, se puede decir que este trabajo deja de manifiesto la importancia del empleo de nanopartículas electrogeneradas de Fe₃O₄ en el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos, lo cual representa un aporte muy significativo, dado que los escasos trabajos que reportan el uso de magnetita, se refieren a nanopartículas obtenidas químicamente. Así, se reporta por primera vez un sensor electroquímico para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y un biosensor amperométrico para la cuantificación de glucosa aún en muestras tan complejas como suero sanguíneo humano con excelentes características analíticas. El otro aporte novedoso de este trabajo puede resumirse en la propuesta de un sensor electroquímico basado en el

empleo de un compósito de grafito modificado con óxido de grafeno reducido con AA, por primera vez aplicado a la detección de dopamina en presencia de AA y Ser mediante la combinación de las ventajas del *stripping* adsorptivo con cambio de medio y de la voltamperometría de pulso diferencial.

Los sensores propuestos en este trabajo representan una ventajosa alternativa para futuros desarrollos de (bio)sensores electroquímicos para analitos de relevancia empleando otras moléculas de biorreconocimiento y nuevos esquemas de transducción.



*“Es un milagro que la curiosidad sobreviva a
los sistemas formales de educación”.*

Albert Einstein.

Capítulo VII

Conclusiones generales

Conclusiones generales

En este trabajo de tesis se desarrollaron sensores electroquímicos basados en el empleo de compósitos de grafito modificados con nanopartículas electrogeneradas de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4) o grafeno (CPE-R-GrO), dirigidos a la cuantificación de bioanalitos de gran relevancia clínica como peróxido de hidrógeno, glucosa y dopamina.

Las excelentes propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de Fe_3O_4 incorporadas en el compósito posibilitaron una notable disminución de los sobrepotenciales para la reducción de peróxido de hidrógeno y un gran incremento de las corrientes asociadas. Tomando ventajas de esta importante actividad catalítica de las nanopartículas de Fe_3O_4 , se logró la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno a muy bajos potenciales (-0,100 V) con la consecuente mejora en la sensibilidad y selectividad, desafíos de gran actualidad en el desarrollo de nuevas plataformas analíticas para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y analitos relacionados metabólicamente.

La incorporación conjunta de distintas proteínas (insulina, GOx, ovolisozima, mucina, albúmina y caseína) y de Fe_3O_4 en el compósito de grafito permitió obtener una drástica mejora en la reducción de peróxido de hidrógeno debido al sinergismo producido por el aumento considerable de la superficie electrocatalítica expuesta producido por una más eficiente dispersión de las nanopartículas. El efecto sinérgico entre Fe_3O_4 y la proteína, que se tradujo en una significativa disminución de la R_{tc} , en un marcado incremento de la sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno y en una mayor repetitividad en la respuesta amperométrica, fue altamente dependiente de la relación entre las proporciones de Fe_3O_4 y proteína.

La naturaleza de la proteína incorporada en el compósito demostró ser un aspecto fundamental en el poder dispersivo de las nanopartículas electrocatalíticas, siendo la respuesta obtenida una combinación de diversas contribuciones entre las que se cuenta la densidad de residuos hidrofóbicos de la proteína, su tamaño y su estructura tridimensional. Los resultados obtenidos a partir de estudios realizados con diferentes

proteínas demostraron que el mejor desempeño analítico se obtuvo a partir de la modificación de CPE-Fe₃O₄ con Alb.

A partir de la plataforma optimizada de CPE-Fe₃O₄ y su combinación con GOx (CPE-Fe₃O₄-GOx) se desarrolló un biosensor amperométrico para glucosa sensible, selectivo, reproducible, estable y rápido, demostrando que el compósito modificado con Fe₃O₄ proporciona a la enzima un microambiente óptimo que hace posible no sólo una eficiente inmovilización, sino también una muy buena actividad biocatalítica.

El biosensor desarrollado presentó excelente selectividad hacia glucosa, aún en gran exceso de AA y AU, permitiendo su empleo para la detección directa de glucosa en suero sanguíneo humano con una excelente correlación con la técnica enzimático-espectrofotométrica estándar empleada habitualmente en la bioquímica clínica.

Otro aspecto abordado en este trabajo de tesis fue el estudio de un nuevo material compósito para el desarrollo de sensores electroquímicos basados en la incorporación de R-GrO sintetizado a partir de la oxidación química de grafito y la reducción de GrO con AA. Los sensores resultantes presentaron una importante mejora en la respuesta electroquímica de Do debido al efecto electrocatalítico de R-GrO y a la eficiente adsorción del neurotransmisor en el electrodo compósito. A partir de la utilización de la metodología de *stripping* voltamperométrico adsorptivo con cambio de medio asociada con voltamperometría de pulso diferencial, se logró la determinación de Do a niveles submicromolares aún en presencia de un exceso de AA y de serotonina. De este modo, la modificación de CPE con R-GrO representa una alternativa novedosa para la cuantificación electroquímica sensible y selectiva de Do, mucho más simple y práctica y menos costosa que las obtenidas empleando nanotubos de carbono.

A modo de corolario final, se puede decir que este trabajo deja de manifiesto la importancia del empleo de nanopartículas electrogeneradas de Fe₃O₄ en el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos, lo cual representa un aporte muy significativo, dado que los escasos trabajos que reportan el uso de magnetita, se refieren a nanopartículas obtenidas químicamente. Así, se reporta por primera vez un sensor electroquímico para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y un biosensor amperométrico para la cuantificación de glucosa aún en muestras tan complejas como suero sanguíneo humano con excelentes características analíticas. El otro aporte novedoso de este trabajo puede resumirse en la propuesta de un sensor electroquímico basado en el

empleo de un compósito de grafito modificado con óxido de grafeno reducido con AA, por primera vez aplicado a la detección de dopamina en presencia de AA y Ser mediante la combinación de las ventajas del *stripping* adsorptivo con cambio de medio y de la voltamperometría de pulso diferencial.

Los sensores propuestos en este trabajo representan una ventajosa alternativa para futuros desarrollos de (bio)sensores electroquímicos para analitos de relevancia empleando otras moléculas de biorreconocimiento y nuevos esquemas de transducción.



“Es un milagro que la curiosidad sobreviva a los sistemas formales de educación”.

Albert Einstein.

Capítulo VII

Conclusiones generales



Conclusiones generales

En este trabajo de tesis se desarrollaron sensores electroquímicos basados en el empleo de compósitos de grafito modificados con nanopartículas electrogeneradas de Fe_3O_4 (CPE- Fe_3O_4) o grafeno (CPE-R-GrO), dirigidos a la cuantificación de bioanalitos de gran relevancia clínica como peróxido de hidrógeno, glucosa y dopamina.

Las excelentes propiedades electrocatalíticas de las nanopartículas de Fe_3O_4 incorporadas en el compósito posibilitaron una notable disminución de los sobrepotenciales para la reducción de peróxido de hidrógeno y un gran incremento de las corrientes asociadas. Tomando ventajas de esta importante actividad catalítica de las nanopartículas de Fe_3O_4 , se logró la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno a muy bajos potenciales (-0,100 V) con la consecuente mejora en la sensibilidad y selectividad, desafíos de gran actualidad en el desarrollo de nuevas plataformas analíticas para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y analitos relacionados metabólicamente.

La incorporación conjunta de distintas proteínas (insulina, GOx, ovolisozima, mucina, albúmina y caseína) y de Fe_3O_4 en el compósito de grafito permitió obtener una drástica mejora en la reducción de peróxido de hidrógeno debido al sinergismo producido por el aumento considerable de la superficie electrocatalítica expuesta producido por una más eficiente dispersión de las nanopartículas. El efecto sinérgico entre Fe_3O_4 y la proteína, que se tradujo en una significativa disminución de la R_{tc} , en un marcado incremento de la sensibilidad hacia la reducción del peróxido de hidrógeno y en una mayor repetitividad en la respuesta amperométrica, fue altamente dependiente de la relación entre las proporciones de Fe_3O_4 y proteína.

La naturaleza de la proteína incorporada en el compósito demostró ser un aspecto fundamental en el poder dispersivo de las nanopartículas electrocatalíticas, siendo la respuesta obtenida una combinación de diversas contribuciones entre las que se cuenta la densidad de residuos hidrofóbicos de la proteína, su tamaño y su estructura tridimensional. Los resultados obtenidos a partir de estudios realizados con diferentes

proteínas demostraron que el mejor desempeño analítico se obtuvo a partir de la modificación de CPE-Fe₃O₄ con Alb.

A partir de la plataforma optimizada de CPE-Fe₃O₄ y su combinación con GOx (CPE-Fe₃O₄-GOx) se desarrolló un biosensor amperométrico para glucosa sensible, selectivo, reproducible, estable y rápido, demostrando que el compósito modificado con Fe₃O₄ proporciona a la enzima un microambiente óptimo que hace posible no sólo una eficiente inmovilización, sino también una muy buena actividad biocatalítica.

El biosensor desarrollado presentó excelente selectividad hacia glucosa, aún en gran exceso de AA y AU, permitiendo su empleo para la detección directa de glucosa en suero sanguíneo humano con una excelente correlación con la técnica enzimático-espectrofotométrica estándar empleada habitualmente en la bioquímica clínica.

Otro aspecto abordado en este trabajo de tesis fue el estudio de un nuevo material compósito para el desarrollo de sensores electroquímicos basados en la incorporación de R-GrO sintetizado a partir de la oxidación química de grafito y la reducción de GrO con AA. Los sensores resultantes presentaron una importante mejora en la respuesta electroquímica de Do debido al efecto electrocatalítico de R-GrO y a la eficiente adsorción del neurotransmisor en el electrodo compósito. A partir de la utilización de la metodología de *stripping* voltamperométrico adsorptivo con cambio de medio asociada con voltamperometría de pulso diferencial, se logró la determinación de Do a niveles submicromolares aún en presencia de un exceso de AA y de serotonina. De este modo, la modificación de CPE con R-GrO representa una alternativa novedosa para la cuantificación electroquímica sensible y selectiva de Do, mucho más simple y práctica y menos costosa que las obtenidas empleando nanotubos de carbono.

A modo de corolario final, se puede decir que este trabajo deja de manifiesto la importancia del empleo de nanopartículas electrogeneradas de Fe₃O₄ en el desarrollo de (bio)sensores electroquímicos, lo cual representa un aporte muy significativo, dado que los escasos trabajos que reportan el uso de magnetita, se refieren a nanopartículas obtenidas químicamente. Así, se reporta por primera vez un sensor electroquímico para la cuantificación de peróxido de hidrógeno y un biosensor amperométrico para la cuantificación de glucosa aún en muestras tan complejas como suero sanguíneo humano con excelentes características analíticas. El otro aporte novedoso de este trabajo puede resumirse en la propuesta de un sensor electroquímico basado en el

empleo de un compósito de grafito modificado con óxido de grafeno reducido con AA, por primera vez aplicado a la detección de dopamina en presencia de AA y Ser mediante la combinación de las ventajas del *stripping* adsorbtivo con cambio de medio y de la voltamperometría de pulso diferencial.

Los sensores propuestos en este trabajo representan una ventajosa alternativa para futuros desarrollos de (bio)sensores electroquímicos para analitos de relevancia empleando otras moléculas de biorreconocimiento y nuevos esquemas de transducción.

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.