

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS  
UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

# **Sensores nanoestructurados para la determinación de azúcares**

**Trabajo Fin de Máster**

**Beatriz Pérez Fernández  
22 de Julio de 2013, Oviedo**

**AGUSTÍN COSTA GARCÍA**, Catedrático de Química Analítica, adscrito al Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**Sensores nanoestructurados para la determinación de azúcares**” ha sido realizado por la licenciada **Beatriz Pérez Fernández** en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio de 2013



Fdo: Agustín Costa García

**DANIEL MARTÍN YERGA**, Personal Investigador en Formación, adscrito al Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**Sensores nanoestructurados para la determinación de azúcares**” ha sido realizado por la licenciada **Beatriz Pérez Fernández** en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su codirección constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio de 2013



Fdo: Daniel Martín Yerga

A mi familia y amigos.

# Índice

I. ABREVIATURAS .....	7
II. ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
III. ÍNDICE DE TABLAS .....	12
IV. INTRODUCCIÓN .....	14
1. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	15
2. TÉCNICAS PARA DETERMINAR CARBOHIDRATOS .....	16
2.1. Ensayos cualitativos .....	16
2.2. Método Miller.....	16
2.3. Polarimetría .....	17
2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución .....	18
2.5. Sensor electroquímico.....	19
3. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	23
3.1. Fabricación de electrodos serigrafiados.....	24
3.2. Ventajas e Inconvenientes de los SPEs.....	26
4. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	27
4.1. Nanopartículas de níquel (NiNP).....	28
5. NANOESTRUCTURACIÓN DE ELECTRODOS .....	29
5.1. Nanoestructuración de SPEs con NiNP.....	30
6. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS QUE EMPLEAN Ni PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES .....	31
7. OBJETIVOS.....	32
V. MATERIAL Y REACTIVOS.....	33
1. INSTRUMENTACIÓN.....	34
2. ELECTRODOS.....	34
3. REACTIVOS .....	35
3.1 Reactivos utilizados para la modificación de los electrodos con NiNP .....	35
3.2 Reactivos utilizados para el análisis de azúcares.....	35
3.3 Reactivos utilizados para el estudio de interferencias .....	36
3.4 Reactivos generales.....	36

<b>VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
1. NANESTRUCTURACIÓN CON NÍQUEL .....	38
2. ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA DE NiNP .....	38
3. ANÁLISIS DE AZÚCARES .....	38
4. ESTUDIO DE INTERFERENTES.....	39
5. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES.....	39
6. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS .....	39
<b>VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
1. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LAS ESPECIES DE INTERÉS.....	44
2. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE AZÚCARES REDUCTORES SOBRE NiNP-SPEs.....	47
3. OPTIMIZACIÓN DE LA NANOESTRUCTURACIÓN CON NiNP Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA.....	49
4. OPTIMIZACIÓN DE LA CRONOAMPEROMETRÍA .....	52
5. COMPORTAMIENTO ANALÍTICO DEL SENSOR .....	52
6. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD .....	54
7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD.....	55
8. ESTUDIO DE INTERFERENTES.....	55
9. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES.....	56
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>IX. FUTUROS PROYECTOS .....</b>	<b>61</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>XI. ANEXO .....</b>	<b>67</b>

## **I. ABREVIATURAS**

**√: Raíz Cuadrada.**

**AA: Ácido Ascórbico.**

**Abs: Absorbancia.**

**Ac: Anticuerpo.**

**ADN: Ácido Desoxirribonucleico**

**Ag: Antígeno.**

**AR: Azúcares Reductores.**

**ARN: Ácido Ribonucleico.**

**CA: Cronoamperometría.**

**CP: Cronopotenciometría.**

**CV: Voltamperometría Cíclica.**

**DM: Diabetes Mellitus.**

**DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.**

**f.e: Fase estacionaria.**

**f.m: Fase móvil.**

**FAD: Flavín Adenín Dinucleótido.**

**FADH<sub>2</sub>: Forma reducida del FAD.**

**FET: Field – Effect Transistors.**

**Fruc: Fructosa.**

**Glu: Glucosa.**

**GOx: Glucosa Oxidasa.**

**HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

**IR: Infrarrojo.**

**ISE: Ion Selective Electrode.**

**JFET: Junction Field – Effect Transistors.**

**LD: Límite de Detección.**

**Med: Mediador.**

**MISFET: Metal – Insulator - Semiconductor Field – Effect Transistors.**

**MNP: Nanopartículas Metálicas**

**MNP-SPEs: Electrodo serigrafiado modificado con nanopartículas metálicas.**

**MOSFET: Metal – Oxide - Semiconductor Field – Effect Transistors.**

**NiNP: Nanopartículas de Níquel.**

**NP: Nanopartículas.**

**Rs: Resolución.**

**RSD%: Desviación Estándar Relativa (en %).**

**SAMs: Monocapas Autoensambladas.**

**SPEs: Electrodo serigrafiado.**

**V.B: Velocidad de Barrido.**

## **II. ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Fig. 1 Estructura abierta</i> .....	15
<i>Fig. 2 Estructura cerrada</i> .....	15
<i>Fig. 3 Polarización de la luz</i> .....	17
<i>Fig. 4 Cromatograma con la separación de diversos azúcares</i> .....	19
<i>Fig. 5 Esquema sensor químico</i> .....	20
<i>Fig. 6 Tira reactiva para la medida de Glucosa en sangre</i> .....	21
<i>Fig. 7 Variedad de SPEs</i> .....	24
<i>Fig. 8 Esquema de la fabricación de SPEs</i> .....	25
<i>Fig. 9 Esquema electrodo DS 110</i> .....	35
<i>Fig. 10 Conector DropSens DSC</i> .....	35
<i>Fig. 11 a) Salto de potencial, b) Perfiles de concentración, c) Respuesta <math>i</math> vs <math>t</math></i> .....	40
<i>Fig. 12 a) Pulso de corriente, b) Perfiles de concentración, c) Respuesta <math>E</math> vs <math>t</math></i> .....	41
<i>Fig. 13 CV de 0.1 M NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaCl</i> .....	44
<i>Fig. 14 CV de NaOH sin activación</i> .....	45
<i>Fig. 15 Comparación de CV de NaOH (a) sin activación, (b) con activación pero sin 50CV, (c) con activación y 50CV</i> .....	46
<i>Fig. 16 Efecto de la etapa de estabilización</i> .....	47
<i>Fig. 17 Variación de la señal de Glucosa (a) SPE sin modificar, (b) SPE modificado sin activación, (c) SPE modificado con activación</i> .....	48
<i>Fig. 18 Respuesta del sensor a NaOH, Glucosa y Fructosa</i> .....	49
<i>Fig. 19 Optimización de la concentración de Ni para la nanoestructuración</i> .....	50
<i>Fig. 20 Optimización del tiempo y la intensidad de reducción para la deposición de Ni</i> ...50	50
<i>Fig. 21 Cronopotenciograma de la deposición de Ni</i> .....	51
<i>Fig. 22 Imagen SEM de nanopartículas de Ni</i> .....	51
<i>Fig. 23 Calibrado de Glucosa y Fructosa</i> .....	52
<i>Fig. 24 Calibrado de Glucosa y Fructosa en la misma muestra</i> .....	53
<i>Fig. 25 Estudio de Repetitividad y Reproducibilidad</i> .....	54
<i>Fig. 26 Estabilidad del electrodo</i> .....	55
<i>Fig. 27 Señal de Glucosa y Glucosa + AA</i> .....	56
<i>Fig. 28 Adiciones estándar para la muestra</i> .....	56
<i>Fig. 29 Gráficas de CA de la muestra</i> .....	57
<i>Fig. 30 Recta de adición estándar para la muestra</i> .....	57

### **III. ÍNDICE DE TABLAS**

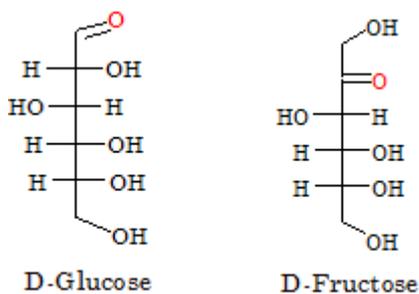
<i>Tabla. 1 Optimización de la activación superficial.....</i>	<b>68</b>
<i>Tabla. 2 Optimización de la concentración de Ni (II).....</i>	<b>68</b>
<i>Tabla. 3 Optimización de la intensidad de reducción del Ni (II).....</i>	<b>68</b>
<i>Tabla. 4 Optimización del tiempo de reducción de Ni (II).....</i>	<b>68</b>
<i>Tabla. 5 Optimización de la intensidad de oxidación.....</i>	<b>68</b>
<i>Tabla. 6 Calibrado de Glucosa.....</i>	<b>69</b>
<i>Tabla. 7 Calibrado de Fructosa.....</i>	<b>69</b>
<i>Tabla. 8 Calibrado de Glucosa y Fructosa conjunto.....</i>	<b>69</b>
<i>Tabla. 9 Repetitividad.....</i>	<b>69</b>
<i>Tabla. 10 Reproducibilidad.....</i>	<b>70</b>
<i>Tabla. 11 Estabilidad del electrodo.....</i>	<b>70</b>
<i>Tabla. 12 Muestra de Miel.....</i>	<b>70</b>

## **IV. INTRODUCCIÓN**

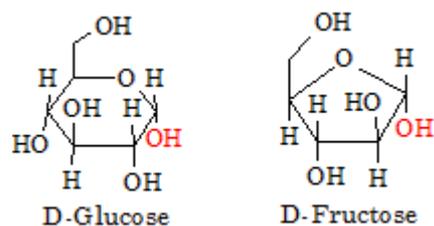
# 1. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Aunque la determinación de azúcares, especialmente glucosa, es crítica en análisis clínicos, la cuantificación de algunos de estos azúcares, como los reductores (glucosa, fructosa, etc.) ha cobrado gran importancia también en el campo agroalimentario.

El interés en análisis clínico es debido a que los carbohidratos o glúcidos son la principal fuente de energía para el cuerpo, aunque también juegan un papel que afecta al organismo de manera perjudicial cuando las personas padecen la enfermedad Diabetes Mellitus [1]. Pacientes con esta enfermedad deben controlar de manera efectiva la cantidad de carbohidratos en los alimentos que toman, por tanto, tan importante como el análisis de glucosa en sangre es el análisis de azúcares en los alimentos y bebidas. Otra utilidad de la determinación de azúcares es su control en los procesos de producción de los alimentos para conocer el valor nutricional de los componentes digeribles de los mismos, donde los principales carbohidratos son la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la maltosa, etc.



*Fig. 1 Estructura abierta.*



*Fig. 2 Estructura cerrada.*

Los denominados azúcares reductores (AR) son aquellos que presentan un grupo carbonilo intacto (Fig. 1 y Fig. 2) en su estructura, a través del cual pueden actuar como reductores con otras moléculas, es decir, son fácilmente oxidables. Todos los carbohidratos son moléculas pequeñas, solubles en agua (glucosa y fructosa) o cadenas, como el almidón y la celulosa, que se forman por la unión de subunidades del azúcar.

## **2. TÉCNICAS PARA DETERMINAR CARBOHIDRATOS**

### **2.1. Ensayos cualitativos**

Como se indicó anteriormente los AR poseen un grupo carbonilo libre, por lo tanto, se podrían realizar las pruebas de Tollens, Benedict o Fehling para determinar si una muestra contiene o no este tipo de moléculas. En cambio los carbohidratos que no contienen grupos hemiacetal, es decir, los azúcares no reductores no reaccionan positivamente en estas pruebas.

El ensayo de Tollens [2] consiste en hacer reaccionar el azúcar con  $\text{Ag}^+$  en solución acuosa de amoníaco, formándose un espejo brillante de  $\text{Ag}^0$ . En el ensayo de Benedict [3] reacciona con  $\text{Cu}^{2+}$  en solución acuosa de citrato y en el ensayo de Fehling los azúcares reaccionan con  $\text{Cu}^{2+}$  en solución de tártaro. En todos estos ensayos los AR se oxidan reduciendo al ion metálico, en los casos de Benedict y Fehling se obtiene  $\text{Cu}^+$  que a su vez reacciona con agua para dar lugar a  $\text{Cu}_2\text{O}$  de color rojo.

### **2.2. Método Miller**

El método de Miller [4] es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540nm de los AR. Esta técnica sirve para cuantificar los AR producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática. Por lo tanto, se aplica esta técnica para la construcción de una curva patrón de glucosa que será una referencia para próximos experimentos.

Este método se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por el AR al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo), cuya presencia puede detectarse por la medida de la Absorbancia (Abs) en la zona de 540-570nm. La concentración está relacionada con la Abs según la ecuación de Lambert-Beer (1).

$$Abs = \varepsilon b c \quad (1)$$

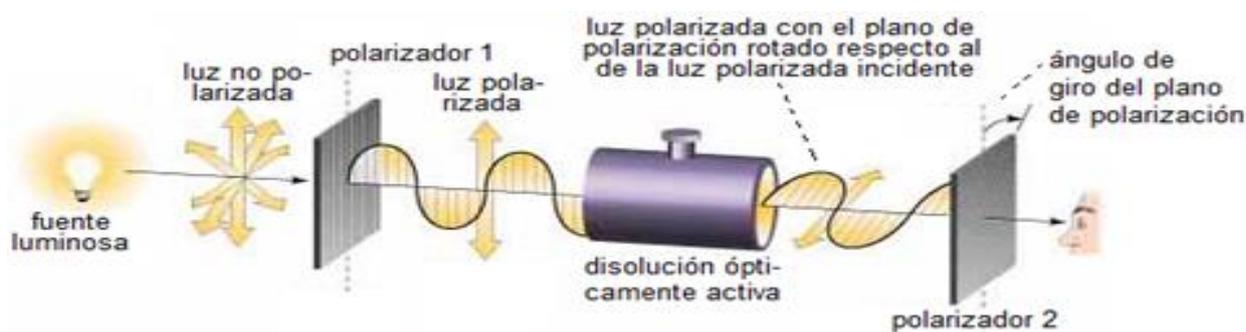
Donde  $\epsilon$  es la absorptividad molar ( $L/mol \cdot cm$ ),  $b$  el paso óptico de la celda ( $cm$ ) y  $c$  la concentración ( $mol/L$ ), en este caso de AR.

### 2.3. Polarimetría

La Polarimetría [5] es un método de análisis muy utilizado que relaciona la propiedad óptica en la que el plano de un rayo de luz linealmente polarizado rota durante su transmisión, a través de un medio de transporte homogéneo que contiene una especie ópticamente activa.

La señal analítica es la actividad óptica, que mide el ángulo de giro del plano de polarización cuando un haz de luz polarizada en un plano atraviesa una solución que contiene un analito ópticamente activo.

Medimos la actividad óptica, que es la propiedad relacionada con el fenómeno observado cuando un haz de luz polarizada en un plano atraviesa una solución que contiene el analito (molécula orgánica, ópticamente activa) girando el plano de polarización.



*Fig. 3 Polarización de la luz.*

La actividad óptica es consecuencia directa de la estereoquímica tetraédrica del carbono con hibridación  $sp^3$  con cuatro grupos sustituyentes distintos, proporcionando centros quirales, es decir, moléculas enantioméricas. Estos enantiómeros son idénticos en todas sus propiedades físicas, excepto en la dirección en la que gira la luz polarizada, clasificándose en levógiros ( $-$ ) cuando el plano de polarización gira hacia la izquierda, o dextrógiros ( $+$ ) cuando este gira hacia la derecha. Por tanto, con esta técnica también es posible diferenciar enantiómeros.

Para el caso de tener  $\alpha$ -D-Glucosa tenemos una  $[\alpha]_{D^{20}} = +112.2^\circ$  y para la  $\beta$ -D-Glucosa será  $[\alpha]_{D^{20}} = +18.7^\circ$ , pero como se llega a establecer un equilibrio entre las dos formas de la D-Glucosa la rotación es  $[\alpha]_{D^{20}} = +52.7^\circ$ , este será el valor que se tendría en cuenta para soluciones puras de Glucosa [6].

Para el caso de la Fructosa la mutarrotación en soluciones acuosas es más compleja que en el caso de la glucosa, ya que el equilibrio no sólo se establece entre las formas  $\alpha$  y  $\beta$ , sino también entre la estructura anular furanósica y piranósica. La levorrotación inicial es bastante elevada,  $[\alpha]_{D^{20}} = -132.2^\circ$ , y disminuye hasta  $[\alpha]_{D^{20}} = -92.4^\circ$ , que será el valor que se utiliza para su determinación mediante polarimetría.

## **2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

La técnica cromatográfica HPLC [7], [8] es la más utilizada para separar compuestos de una muestra, haciendo uso de una fase móvil (f.m) líquida y una fase estacionaria (f.e) sólida formada por partículas muy finas empaquetadas en una columna.

Para que tenga lugar la separación se introduce un pequeño volumen de muestra en la f.m bombeada a través de la columna que contiene la f.e y donde interaccionan los analitos con la f.e. Estas interacciones provocan velocidades diferenciales de los analitos que producen la separación de los mismos al final de la columna. Según la naturaleza de los analitos que queramos separar se utilizan f.m y f.e diferentes.

La HPLC proporciona muy buenas separaciones e identificaciones de analitos en un tiempo corto, tanto cualitativa como cuantitativamente. Es necesario que la muestra sea soluble en la f.m. Para el caso de los azúcares tiene grandes ventajas ya que estos analitos tienen gran solubilidad en agua, además de que es una técnica idónea para especies no volátiles o termolábiles. Otras ventajas de esta técnica son su alta sensibilidad, y la posibilidad de determinar sustancias tan diversas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, y gran variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas.

En el particular caso de análisis de azúcares en alimentos, la cuantificación de la mayoría de los mono y disacáridos (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa), es llevada a cabo sin ningún aislamiento ni derivatización previa, aplicando HPLC. Sin embargo, para las disoluciones acuosas de estos azúcares se obtiene una limitada resolución, sensibilidad y selectividad. Avances en este campo, como la columna de grafito acoplada a detección amperométrica pulsada han ayudado a mejorar estos análisis. Con la detección indirecta usando HPLC de fase inversa se ha conseguido la cuantificación de azúcares a niveles traza, incluyendo los no reductores, aplicando elución en gradiente. El acoplamiento de HPLC con ESI-MS ha permitido, además, obtener información estructural sobre estos analitos [31].

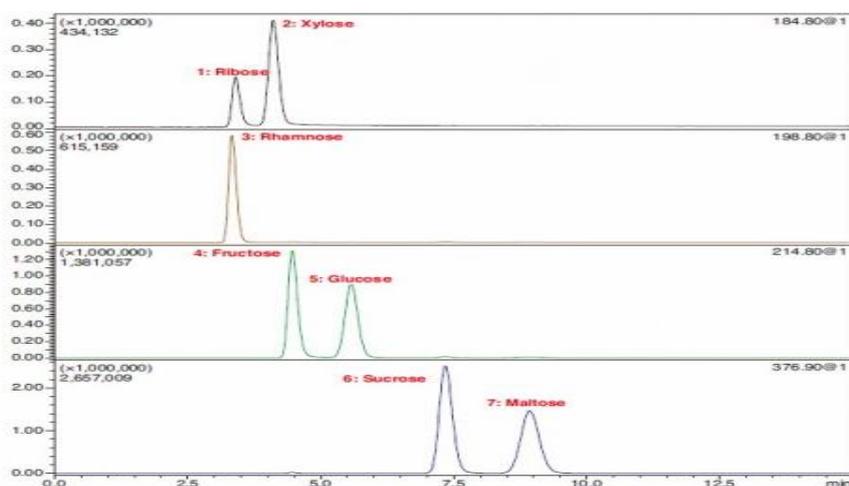


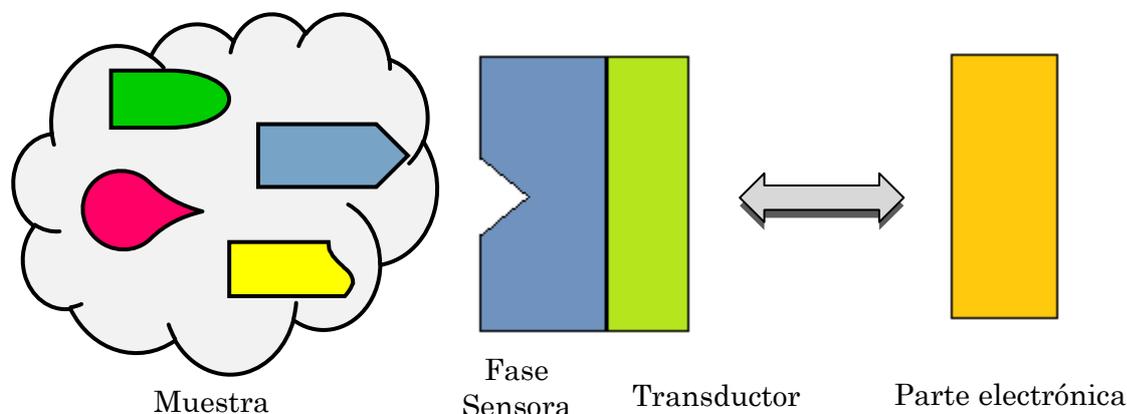
Fig. 4 Cromatograma con la separación de diversos azúcares.

## 2.5. Sensor electroquímico

Actualmente los sensores electroquímicos están en un momento de auge en el campo de Análisis Químico, sobre todo en el ámbito clínico, ya que a día de hoy la forma con la que se determina el contenido de glucosa en sangre de manera rápida es a través de este tipo de dispositivos.

Un sensor químico [10] es un dispositivo que utiliza el reconocimiento molecular de una especie química por un receptor inmovilizado para detectar y/o cuantificar dicha especie mediante una señal generada por simple contacto del dispositivo con la muestra. Los sensores químicos normalmente están formados por dos com-

ponentes básicos conectados en serie: una fase sensora o sistema de reconocimiento del analito de interés, y un transductor que es capaz de convertir la señal química en una señal eléctrica medible de forma bidireccional.



*Fig. 5 Esquema sensor químico.*

Se llaman Biosensores cuando el sistema de reconocimiento es una especie biológica como una célula, enzima, tejidos, fragmentos de ADN/ARN, etc.

Existen varios tipos de transductores, los más utilizados son los electroquímicos, donde se emplea un electrodo como sistema transductor. La principal ventaja de este tipo de transductor reside en que la señal producida es una señal eléctrica que se puede tratar a continuación de forma sencilla.

Una de las grandes ventajas de los sensores electroquímicos es que son dispositivos que se pueden miniaturizar, producir en masa y por lo tanto su coste de producción es bajo, en comparación, por ejemplo, con equipos de HPLC que debido a su mayor tamaño y complejidad tiene un coste más elevado, tanto su producción como su adquisición.

También estos transductores electroquímicos se caracterizan por su robustez, su sencilla fabricación, y unas de las mayores ventajas son su amplio intervalo de linealidad y muy cortos tiempos de respuesta.

El método más utilizado para determinar glucosa es la inmovilización de Glucosa Oxidasa (GOx) [9] en el electrodo, donde la señal proporcionada es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Para los electro-

dos enzimáticos es muy importante la correcta elección de los modificadores y agentes que se van a inmovilizar junto con la enzima, ya que de ello depende la estabilidad y sensibilidad del electrodo.

Este tipo de biosensor es el utilizado en las tiras de glucosa que se comercializan (Fig. 6) para que los pacientes que presentan diabetes se controlen la cantidad de glucosa en sangre; y se basa en que la GOx cataliza la reacción de oxidación de la glucosa a gluconolactona y peróxido de hidrógeno.

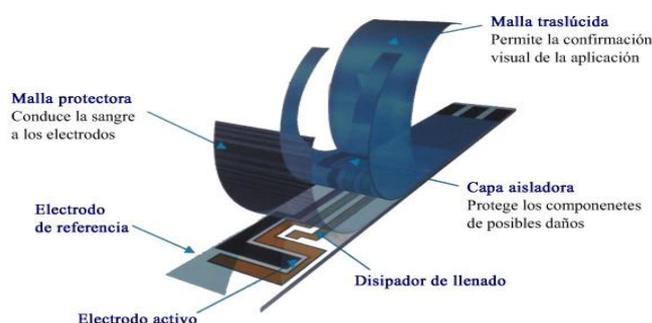
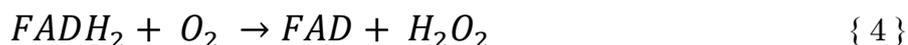


Fig. 6 Tira reactiva para la medida de Glucosa en sangre.

Esta reacción ocurre en varios pasos {1-5} donde hay una transferencia de dos protones y dos electrones al cofactor de la GOx, es decir, al FAD que actúa como aceptor de electrones y se reduce a FADH<sub>2</sub>. A continuación tiene lugar la re-oxidación a FAD mediante el consumo de O<sub>2</sub> {4} y produciendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se reduce a O<sub>2</sub> {5} (que se regenera para continuar el ciclo) eliminando electrones que serán los que den lugar a la señal (potencial de oxidación de +0.6V vs Ag/AgCl) y esta es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra.



En ocasiones el O<sub>2</sub> se sustituye por un mediador que actúa como aceptor de electrones y acelera el intercambio de estos desde el centro redox de la enzima hasta la superficie del transductor. Este sería el caso del sensor de glucosa comercial, donde el mediador es el ion Ferricinio (Fe(Cp)<sub>2</sub><sup>+</sup> que se reduce al Ferroceno

(Fe(Cp)<sub>2</sub>) y se vuelve a oxidar al Ferricinio produciendo electrones que serían par-tícipes de la señal analítica.

### 2.5.1. Tipos de fases sensoras

Algunas de las fases sensoras [9] más empleadas son las siguientes:

— **Enzimática:** En este caso el elemento sensor es una enzima que necesita un aporte de sustrato para que tenga lugar la reacción y dé lugar al producto. Hay varias formas de medir la cantidad de sustrato consumido, puede venir dado por la cantidad de producto formado (señal creciente), detectando la cantidad de co-sustrato consumida (señal decreciente) o midiendo el sistema redox del centro ac-tivo del enzima.

— **Interacción Ag-Ac:** Se basan en reacciones inmunoquímicas. En este caso, el elemento sensor tendría inmovilizado o el Ac o el Ag que sería capaz de reaccio-nar con su reactivo correspondiente (Ac-Ag o Ag-Ac) mediante una unión por afini-dad. Uno de los inconvenientes de estos sensores son las interacciones inespecífi-cas, con otras biomoléculas que no son el analito.

— **Nanomateriales:** Se basan en la alta afinidad de algún nanomaterial por alguna especie química, de manera que produce un efecto que es capaz de diferen-ciar el analito de otras especies que no interaccionan con el nanomaterial. Algunos de estos efectos es la adsorción, o un efecto catalítico.

### 2.5.2. Tipos de detección

Hay varios tipos de detección electroquímica [9].

— **Amperometría:** Se basan en la medida de la corriente producida por la oxidación o reducción de una especie electroactiva. El electrodo se mantiene a po-tenciales constantes durante un período de tiempo determinado.

— **Voltamperometría:** Consiste en el empleo de una técnica voltamperométri-ca para la detección electroquímica del analito de interés. Las técnicas voltampe-rométricas se basan en la aplicación de un barrido de potenciales entre los cuales

se produce un proceso electroquímico que da lugar a la señal analítica en forma de una corriente eléctrica.

— **Potenciometría:** En este caso la señal viene dada por la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y un electrodo indicador, o dos electrodos de referencia separados por una membrana permeable selectiva. El transductor puede ser un electrodo selectivo de iones (ISE), donde el más utilizado es el electrodo de pH, aunque también se pueden utilizar ISE a otros iones como  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NH_4^+$  o gases como  $CO_2$ ,  $NH_3$ .

— **Transistores de Efecto de Campo (FET):** Este tipo de transistores se basan en el campo eléctrico para controlar la conductividad de un canal en un material semiconductor. Los FET se consideran como resistencias extremadamente altas controladas por una diferencia de potencial, puede utilizarse para proporcionar mayor estabilidad térmica. Los FET más conocidos son los JFET que utiliza la unión p-n, los MOSFET utiliza el  $SiO_2$ , y los MISFET, en los que se emplea un aislante.

— **Conductimetría:** Se basa en la conducción eléctrica de los iones en solución, para medir la molaridad de una disolución que está determinado por su carga iónica o salina, de gran movilidad entre dos puntos de diferente potencial. Cuanto mayor sea la relación carga eléctrica / carga iónica de la muestra mayor intensidad se detecta entre los electrodos a una resistencia constante.

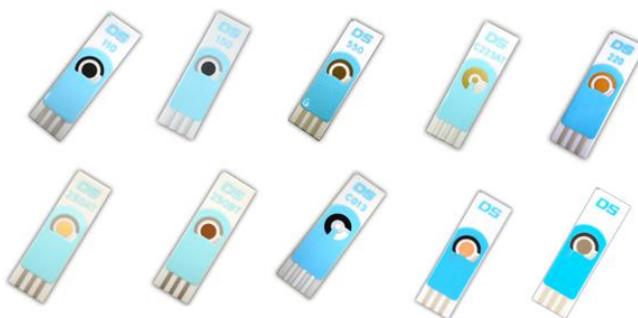
— **Impedancia:** Consiste en la medida de la oposición a la transferencia electrónica de un proceso electroquímico debido a una mayor resistencia en la superficie del electrodo empleado que puede provenir por un mayor recubrimiento con el analito o una especie que se relaciona con el analito.

### **3. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS**

Actualmente los electrodos serigrafados (SPEs) son los más utilizados como transductores para el desarrollo de sensores electroquímicos, debido a sus características, entre las que destaca su gran versatilidad y su posibilidad para modificar

su superficie, por lo que se pueden utilizar para múltiples aplicaciones tanto en industria, clínica, medioambiente, alimentación, como en el ámbito farmacéutico.

El método de fabricación más utilizado es el “*screen-printing*”, pudiendo obtener electrodos planos sólidos, mecánicamente robustos, con la geometría deseada y de materiales diversos.



*Fig. 7 Variedad de SPEs.*

Como se puede observar en la Fig. 7, existe gran variedad de SPEs con diferentes diseños y materiales. Estos electrodos serigrafados son una alternativa a los electrodos de pasta de carbono o carbono vítreo convencionales, que se utilizaban en el análisis electroquímico anteriormente. Presentan varias ventajas entre las que podemos destacar que son químicamente inertes, dan lugar a un rango de potenciales de trabajo amplio con una baja resistencia eléctrica, presentan bajas corrientes de fondo debido a su estructura cristalina y una alta relación señal/ruido.

### **3.1. Fabricación de electrodos serigrafados**

La tecnología de microfabricación por “*screen-printing*” [11] es la más importante para la fabricación en masa de electrodos con finas capas de tintas conductoras. Dichas tintas están compuestas principalmente de grafito de grado sintético (aunque existen de otros materiales), vinilo o base polimérica aglutinante de epoxi y disolventes. Las partículas de grafito electroquímicamente activo son la base del electrodo, el aglutinante se añade para mejorar la afinidad entre la tinta y el sustrato en términos de propiedades de adhesión y fuerzas mecánicas; y el disolvente mejora la viscosidad de la tinta en el proceso de impresión. Los sustratos más utilizados como base de estos electrodos son la cerámica y el

plástico. En el caso de los materiales cerámicos soportan temperaturas mayores a las que soportarían los de plástico.

Como se ha mencionado, además de los SPEs con tinta de carbono también podemos encontrar otros materiales como Oro, Platino, Plata, incluso mezcla de dos componentes, como el grafito – ferrocianuro. El utilizar un electrodo de trabajo u otro depende de la aplicación electroanalítica que se quiera llevar a cabo. Las diferentes tintas que se emplean en la fabricación de los SPEs son un parámetro crítico en su reactividad, ya que pueden presentar diferentes características electrodos fabricados con diferentes tintas [12]. Por lo tanto, es importante el estudio y caracterización de estos electrodos.

El proceso de fabricación, serigrafiado, consiste en la colocación de una plantilla sobre el sustrato (cerámica o plástico) pasando sobre esta la tinta y formándose así el electrodo sobre el sustrato con la forma deseada. A esto le sigue una etapa de secado y curado final a una  $T^a$  determinada y específica para cada tipo de tinta. Esta  $T^a$  de curado puede influir mucho en las características del electrodo. Como etapa final se recubre con un aislante para que solamente queden libres las conexiones y los tres electrodos (trabajo, auxiliar y referencia).[13] Este procedimiento se puede observar a continuación en la Fig. 8.

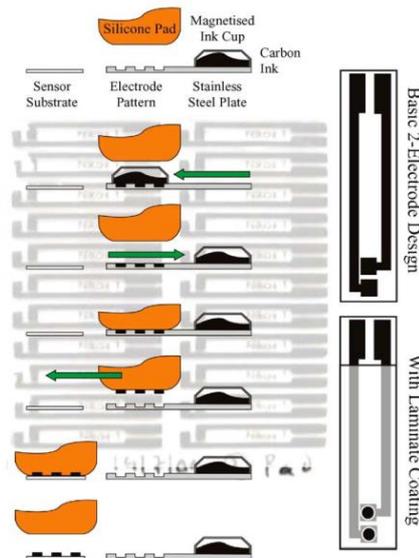


Fig. 8 Esquema de la fabricación de SPEs.

### 3.2. Ventajas e Inconvenientes de los SPEs

Debido a las importantes ventajas que presentan los SPEs frente a otras herramientas actualmente son los más utilizados en sensores electroquímicos. Sus ventajas son las siguientes:

— **Bajo coste:** este tipo de dispositivos se pueden producir de forma automatizada y en masa, por lo que su precio final es relativamente bajo. Debido a esto son electrodos desechables, se pueden eliminar después de realizar un análisis. Esta característica es muy importante, ya que en ciertos análisis con muestras complejas no se podría realizar otra medida con ese mismo electrodo ya que puede degradar la superficie electródica.

— **Flexibilidad del diseño:** como se pudo observar en la Fig. 7, se pueden fabricar diversos tipos de electrodos y con diferentes diseños, dependiendo de la utilidad que se le quiera dar a cada uno de ellos. También existe gran variedad de materiales electródicos [14] que se pueden utilizar en la fabricación (carbono, metales, recubiertos por una película o modificados con sustancias biológicas, como pueden ser enzimas, Ac, ADN....)

— **Pequeño tamaño:** se trata de dispositivos portátiles, de fácil manejo y transporte, haciendo posible su aplicación en análisis “*in situ*”, es decir, no sería necesario el traslado de las muestras al laboratorio. Debido al reducido tamaño de estos electrodos la cantidad de muestra necesaria para el análisis es muy pequeña, unos pocos  $\mu\text{L}$ . Otra ventaja es que el propio electrodo es la celda electroquímica ya que posee los electrodos de trabajo, auxiliar y de referencia en el mismo dispositivo, sin tener la necesidad de una celda externa para realizar el análisis.

— **Fácil integración con circuitos electrónicos:** estos dispositivos se conectan directamente al equipo de medida y no es necesario un tratamiento de la señal que se produce, ya que es directamente una señal eléctrica.

— **Posibilidad de pretratamientos y modificaciones:** otra de las ventajas es la fácil modificación de la superficie del electrodo con otros materiales, debido a la geometría y materiales con los que se fabrican, mejorando así sus propiedades y pudiendo utilizarlos en nuevas aplicaciones. Como se indicó anteriormente la su-

perficie de los SPEs se puede modificar por la adición de membranas o adsorción de material biológico como ADN, proteínas o Ac.

El principal inconveniente de estos electrodos es:

— ***Baja reproducibilidad en la producción:*** aunque el proceso de fabricación está bastante controlado en la actualidad, pueden darse casos en los que exista una diferencia entre diferentes lotes de producción, pero esta baja reproducibilidad se puede mejorar aplicando una etapa de pretratamiento electroquímico en la superficie del electrodo.

#### **4. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

El estudio de materiales que presentan una o más dimensiones de tamaño nanométrico se denomina nanotecnología. Este tipo de materiales presentan unas propiedades distintas a las de los materiales macroscópicos por dos razones: una de ellas es que se comportan según las Leyes de la Química Cuántica y otra es que poseen un área superficial elevada, favoreciendo así los procesos de superficie.

Las nanoestructuras formadas sobre la superficie de los electrodos pueden tener diversas formas como pueden ser las nanopartículas (NP), nanofibras, nanotubos, nanohilos, etc.

Las NP son agrupaciones o conglomerados de 100 a 1000 átomos del elemento con dimensiones nanométricas. Las propiedades físicas dependen del tamaño de estas partículas, por lo que partículas más pequeñas se pueden comportar de diferente manera que las mismas partículas cuando tienen un tamaño superior.

Este tipo de MNP se puede utilizar tanto en sensores como en biosensores electroquímicos. En estos últimos las más utilizadas son las NP de Au ya que son de gran utilidad en la formación de SAMs.

De forma general existen dos métodos para la síntesis de MNP: “*top-down*” (métodos físicos) y “*bottom-up*” (métodos químicos). Los métodos “*top-down*”, tales como división mecánica, deposición y crecimiento de películas, evaporación metáli-

ca, involucra la subdivisión de los metales de partida. En cambio los métodos “*bottom-up*” dan lugar a dispersiones coloidales de NP.

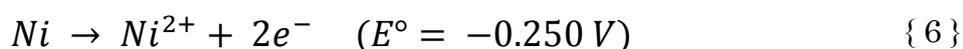
Una de las desventajas del “*top-down*” es que se obtienen imperfecciones en la superficie de los metales, este es el caso de la litografía que puede causar daños cristalográficos en las plantillas y se transfieren en la etapa de grabado. Por lo tanto estas imperfecciones en la superficie producirían problemas en las propiedades físicas y/o químicas de la superficie de los nanomateriales.

En cuanto al método “*bottom-up*” da lugar a NP con menos defectos y una composición química más homogénea. Esto se debe a que hay una disminución de la energía libre de Gibbs, de modo que las NP están próximas a un estado de equilibrio termodinámico. Dentro de este método la reducción de sales de metales de transición es lo más utilizado.

#### 4.1. Nanopartículas de níquel (NiNP)

El níquel es un metal de transición de color blanco plateado con un ligero toque dorado, dúctil y maleable, altamente resistente a la corrosión por lo que se utiliza en la industria del hierro como recubrimiento, mediante electrodeposición, y evitar así la corrosión y dar resistencia al calor. También es muy común su uso en aleaciones, sobre todo en aplicaciones médicas.

El Ni presenta una alta conductividad eléctrica, con valor de  $14.3 \times 10^6$  S/m, por lo que es muy útil en la modificación de SPEs, ya que conducirá perfectamente los electrones producidos en la reacción electroquímica para obtener así la señal eléctrica. Su estado de oxidación normal es +2 en disolución acuosa {6}, pero se puede presentar como 0, +1 y +3, formando complejos. El ion  $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  es de color verde y las soluciones acuosas de las sales de  $\text{Ni}^{2+}$  normalmente presentan este color, como la mayoría de las sales hidratadas.



Se emplea también como catalizador de la hidrogenación de moléculas, es el llamado catalizador Ni Raney (muy utilizado en síntesis orgánica).

Existen diferentes nanoestructuras de Ni con unas propiedades determinadas pero en el trabajo desarrollado, el interés se centra en la generación de NiNP mediante electrodeposición.

#### **4.1.1. Obtención de NiNP**

La electrodeposición es uno de los métodos más eficaces para la formación de estructuras nanométricas hasta macroscópicas. Este mecanismo de crecimiento de NP sobre una superficie tiene como punto crítico la fuerza de interacción que existe entre el átomo y la superficie. Esta electrodeposición sobre una superficie de grafito, como pueden ser los SPEs, se produce a través del mecanismo de nucleación de Volmer-Weber, es decir, la nucleación comienza con la formación de islas de partículas y colapsan para formar una capa o núcleos 3D. Esto tiene lugar a partir de una solución iónica acuosa. [17]

Dependiendo del procedimiento de deposición empleado se obtienen unas nanoestructuras u otras (poliedros regulares, nanocables, nanopartículas, nanotubos, en forma de copos de nieve, etc.).

## **5. NANOESTRUCTURACIÓN DE ELECTRODOS**

Una de las principales características que poseen los SPEs es la facilidad de modificar su superficie, que puede proporcionar un comportamiento totalmente diferente a si el electrodo está sin modificar, por lo que se pueden conseguir mejoras analíticas y utilizar en nuevas aplicaciones.

La nanoestructuración es una de las modificaciones más importantes en los últimos años, ya que se pueden mejorar las propiedades del electrodo gracias a las ventajas que tienen los nanomateriales, como las NiNP.

El uso de MNP sobre la superficie de SPEs presenta varias ventajas:

— Pueden funcionar como catalizador de la reacción electroquímica, disminuyendo así el sobrepotencial necesario para que tenga lugar la reacción y favoreciendo la reversibilidad del proceso.[15]

— Proporcionan una mejora en la transferencia electrónica entre las sustancias electroactivas y el electrodo.

— Como se indicó anteriormente presentan una elevada área superficial, por lo que pueden proporcionar una mejora en la señal, ya que según la ecuación de Randles-Sevcik (2) la intensidad de corriente que se mide es proporcional a la superficie del electrodo.

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} \nu^{1/2} D^{1/2} AC \quad (2)$$

Donde  $i_p$  es la corriente de pico, A es el área del electrodo, D es el coeficiente de difusión.

— El coste de producción de este tipo de electrodos modificados con NP es menor que si se utiliza un electrodo completamente de ese elemento.

Uno de los inconvenientes de las NP es que presentan mayor reactividad que el material macroscópico, y en algunos casos esta propiedad pudiera ser contraproducente.

### **5.1. Nanoestructuración de SPEs con NiNP**

Podríamos realizar diversos métodos de modificación de la superficie de los SPEs con NiNP. Algunos de ellos son:

— Utilizar tintas con NiNP en el mismo momento de la fabricación.

— Adsorber las NiNP sobre el electrodo. Esta adsorción se puede llevar a cabo directamente, colocando una gota con NiNP y realizar una etapa de secado. Con la posterior aplicación de un potencial constante, o con la ayuda de un polímero que se deposite sobre el electrodo y ayude a la adsorción de las NiNP.

— Electrodeposición de NiNP a partir de Ni iónico sobre la superficie del electrodo, aplicando una corriente o potencial eléctrico durante un tiempo determinado, como se explicó anteriormente. Para ello es necesario controlar el tiempo, la corriente de reducción o potencial aplicado y la concentración de Ni (II) iónico, ya que dependiendo de las condiciones puede obtener una diferente nanoestructuración.

Como se explicará más adelante para la deposición de NiNP en este trabajo se utilizará cronopotenciometría en lugar de cronoamperometría (que se utilizará para medir la señal), ya que para los electrodos serigrafiados es más adecuado aplicar una corriente constante que un potencial debido a que tienen electrodos de pseudoreferencia. Si se utiliza un potencial constante el potencial de pseudoreferencia puede variar de un SPE a otro, dando una deposición menos reproducible.

## **6. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS QUE EMPLEAN Ni PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES**

Se han publicado trabajos utilizando métodos electroquímicos que emplean Ni como base del electrodo, algunos de ellos se citarán a continuación con una breve explicación de los electrodos que emplean, el tipo de analitos que estudian, los rangos lineales y límites de detección que obtienen.

— **Referencia [18]:** En este trabajo emplean electrodos de GC (Glassy Carbon), en el que realizan una electrodeposición de Ni en forma de nanohilos (NiN-WAs). Este tipo de electrodos lo emplean para la determinación de glucosa, obteniendo un rango lineal de 0.5-7000 $\mu$ M y un LD de 0.1 $\mu$ M.

— **Referencia [21]:** Este trabajo trata de la modificación de CSPEs (Electrodos serigrafiados de carbono) mediante la formación de nanohilos de Ni y de un híbrido de Ni y Cu. En este caso se realiza la determinación de Glucosa, Fructosa y una mezcla de ambos, obteniéndose un rango lineal de 0.05-1mM para ambas modificaciones. En cambio los LD varían según el analito y el tipo de modificación. En el caso de NiN-WAs para Fructosa y la mezcla se obtiene un LD de 0.04mM y para la Glucosa de 0.06mM. En el caso de NiCuN-WAs para la Glucosa y mezcla obtienen un LD de 0.08mM y para la Fructosa 0.04mM.

— **Referencia [25]:** Este trabajo modifica electrodos serigrafiados de grafito con nanobastones de Ni. En este caso los analitos que determinan son etanol y glicol con rangos y LD diferentes en cada caso. Para el etanol un rango lineal de 2.6-23mM y para el glicol 230-1840 $\mu$ M y unos LD de 1.4mM y 186 $\mu$ M respectivamente.

— **Referencia [29]:** En este trabajo se estudian los azúcares Glucosa, Fructosa, Lactosa y Sacarosa, para ello modifican electrodos de carbono similar al grafito con nanopartículas de Ni (Ni-NDC), obteniéndose los siguientes resultados: LD Glucosa 20nM, Fructosa 25nM, Sacarosa 50nM y Lactosa 37nM y Rangos lineales de Glucosa y Fructosa 0.05-500, Sacarosa 0.10-250 y Lactosa 0.08-250 (en el paper no aparecen unidades).

— **Referencia [30]:** Aquí los electrodos empleados son de nanofibras de pasta de carbono modificados con nanopartículas de Ni (NiCFP). El analito empleado es glucosa con un rango lineal de 2 $\mu$ M-2.5mM y un LD de 1 $\mu$ M.

## **7. OBJETIVOS**

En el presente trabajo se pretende realizar la nanoestructuración de electrodos serigrafados (SPE) con nanopartículas de Ni (NiNP) mediante cronopotenciometría. Para ello será necesario optimizar las condiciones de trabajo, tanto la concentración de Ni<sup>2+</sup>, como el tiempo y la intensidad de reducción aplicada.

Se comprobará el efecto catalítico de los óxidos de Ni (II) frente a los AR, y este efecto se empleará para el desarrollo y optimización de un sensor electroquímico para azúcares.

A continuación se llevará un estudio de las diferentes características analíticas del sensor (rango lineal, límite de detección, reproducibilidad, interferencias, etc.). El objetivo final del trabajo es poder llevar a cabo el análisis de muestras reales de alimentos, como Miel.

## **V. MATERIAL Y REACTIVOS**

## **1. INSTRUMENTACIÓN**

Para realizar el análisis electroquímico y obtener la señal analítica se ha utilizado un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chimie B.V.) controlado mediante el software Autolab GPES versión 4.9.

Para la caracterización microscópica de los electrodos se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 6610LV.

También se empleó una balanza analítica Mettler Toledo AB54.

## **2. ELECTRODOS**

Los electrodos que se utilizaron a lo largo del trabajo fueron electrodos serigrafados DropSens del tipo 110 (Fig. 9), que consisten en tres electrodos serigrafados sobre un sustrato cerámico que posee unas dimensiones de 34 mm de largo, 10 mm de ancho y 0.5 mm de espesor. Estos 3 electrodos presentan distinta disposición y tamaño sobre la cerámica, además de tener distinta función cada uno de ellos: electrodo de trabajo (de forma circular con 4 mm de diámetro de tinta de carbono), electrodo auxiliar (también de tinta de carbono) y otro de referencia (fabricado con tinta de plata, y por lo tanto, funciona como un electrodo de pseudoreferencia)

La celda electroquímica formada por los 3 electrodos y delimitada por un material aislante posee un volumen de 50  $\mu$ L. Además el dispositivo presenta unos contactos eléctricos, fabricados con tinta de plata, para acoplar a un conector que a su vez se conecta al potenciostato.

El conector que actúa como interfase entre los SPEs y el Autolab es el modelo DropSens DSC (Fig. 10).

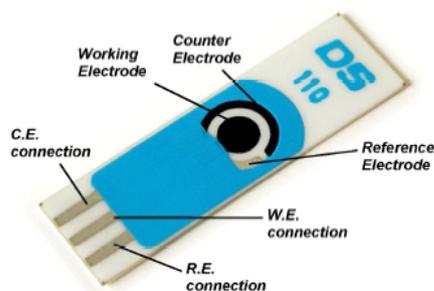


Fig. 10 Esquema electrodo DS 110.



Fig. 9 Conector DropSens DSC.

### 3. REACTIVOS

#### 3.1 Reactivos utilizados

#### para la modificación de los electrodos con NiNP

Se preparó una disolución de  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1 M (Sigma-Aldrich, pureza 99%). Para ello,  $0.6571 \pm 0.0006$  g de  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en una disolución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1 M en  $\text{NaCl}$  0.1 M y se enrasó en un matraz de 25 mL. Esta disolución de níquel es habitualmente utilizada para la generación de nanoestructuras de níquel, [17] [18] mientras que el  $\text{NaCl}$  se emplea para dar una mayor conductividad a la disolución.

La disolución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1 M en  $\text{NaCl}$  0.1 M se preparó pesando  $0.6183 \pm 0.0003$  g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Sigma-Aldrich, 99.5% de pureza) y  $0.5844 \pm 0.0005$  g de  $\text{NaCl}$  (Merck-Millipore, pureza  $\geq 99\%$ ), todo ello en 100 mL de agua ultrapura.

A partir de la disolución de  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1 M se prepararon diluciones para optimizar la concentración de Ni.

También se utilizó una disolución de  $\text{NaOH}$  0.1 M (Merck-Millipore, pureza  $\geq 95\%$ ), para ello se pesaron  $0.4000 \pm 0.0008$  g en 100 mL de agua ultrapura.

#### 3.2 Reactivos utilizados para el análisis de azúcares

Para el análisis de glucosa se preparó diariamente una disolución madre de D-(+)-Glucosa 0.1 M (Merck-Millipore), pesando  $0.0180 \pm 0.0003$  g de D-(+)-Glucosa en

1 mL de NaOH 0.1 M (en tubo eppendorf). A partir de ella se realizaron diluciones en NaOH 0.1 M para obtener la disolución de concentración necesaria.

Para el caso de la Fructosa, al igual que con la Glucosa, se preparó diariamente una disolución de D-(-)-Fructosa 0.1 M (Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 99\%$ ) pesando  $0.0180 \pm 0.0006$  g de D-(-)-Fructosa en 1 mL de NaOH 0.1 M (en tubo eppendorf). A partir de ella, se realizaron diluciones en NaOH 0.1 M para obtener la disolución de concentración deseada.

### **3.3 Reactivos utilizados para el estudio de interferencias**

Disolución de Ácido Ascórbico 0.1 M (Sigma Ultra, pureza  $\geq 99\%$ ), se preparó pesando  $0.0176 \pm 0.0002$  g en 1 mL de NaOH 0.1 M (en tubo eppendorf). A partir de ella se realizaron diluciones en NaOH 0.1 M para obtener la disolución de concentración necesaria.

### **3.4 Reactivos generales**

Durante todo el trabajo se utilizó agua ultra pura obtenida con un sistema de purificación Milli-RO 3 plus/Milli-Q plus 185 (Millipore Ibérica S.A., Madrid).

## **VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

## **1. NANESTRUCTURACIÓN CON NÍQUEL**

La deposición de NiNP sobre los SPEs se realiza mediante cronopotenciometría, aplicando una corriente de reducción de  $-50 \mu\text{A}$  durante un tiempo de 60 s. Para ello, se adiciona sobre el electrodo una gota de  $40 \mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1 M/ $\text{NaCl}$  0.1 M, que presenta iones  $\text{Ni}^{2+}$ . Este procedimiento se realiza para distintas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  (0.1 mM, 1 mM, 10 mM y 100 mM).

Una vez realizada la electrodeposición mediante cronopotenciometría se lava el electrodo con agua Milli-Q.

## **2. ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA DE NiNP**

Una vez se ha depositado el Ni en el electrodo se lleva a cabo una etapa de activación para la generación de óxidos de Ni (II), para ello se utiliza la cronopotenciometría aplicando una intensidad negativa durante un tiempo determinado. Estos dos factores (intensidad y tiempo) fueron optimizados para obtener la mejor activación posible. Este procedimiento se realiza con una gota de  $40 \mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  0.1 M sobre el electrodo. Una vez realizada la activación se lava el electrodo con agua Milli-Q.

Además, es también necesario realizar otra etapa de activación para obtener una superficie electródica de níquel más estable y reproducible. Para ello se realizan 50 ciclos de Voltamperometría Cíclica (CV) con un barrido de potenciales de +0.3 V a +0.7 V (step=2 mV, scan rate=100 mV/s), con una gota de  $40 \mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  0.1 M y posterior lavado con agua Milli-Q.

## **3. ANÁLISIS DE AZÚCARES**

Para realizar el análisis de los azúcares (glucosa, fructosa o mezcla glucosa/fructosa), tras realizar la deposición de NiNP y las etapas de activación, se añan-

de una gota de 40  $\mu\text{L}$  de la disolución adecuada y se realiza una cronoamperometría aplicando un potencial de oxidación constante de +0.6 V. La señal analítica es la medida de la corriente generada cuando se hace constante (aprox. 120 s).

#### **4. ESTUDIO DE INTERFERENTES**

Como se vio en la bibliografía [18] el principal interferente para los azúcares reductores en muestra de alimentos es el AA. Para el estudio del efecto de esta especie, se prepara una disolución de AA conjuntamente con Glucosa en una relación 1:10 (AA : Glu). El análisis se realiza de la misma manera que se ha explicado en el apartado anterior.

#### **5. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES**

El pretratamiento realizado en las muestras reales fue el siguiente:

Para el caso de la miel, se pesó en la balanza analítica 1.0062 g de muestra y se enrasó con 50 mL con agua Milli-Q. Se realizó una dilución (1:10) añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de muestra a 900  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M. Y por último se añadió 25  $\mu\text{L}$  de la anterior disolución a 975  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M (dilución 1:40). [20]

El análisis electroquímico se realiza de la misma manera que se ha explicado en el apartado 3.

#### **6. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS**

Aunque no sea realmente una parte del procedimiento experimental, se deben introducir brevemente las técnicas electroquímicas empleadas tanto para la deposición de NiNP, como para el análisis de azúcares con el sensor.

Para el análisis electroquímico de los azúcares con el sensor se utiliza la técnica de *cronoamperometría* (CA), que consiste en aplicar un salto de potencial como señal de excitación al electrodo de trabajo en régimen de reposo. La respuesta ob-

tenida es la intensidad de corriente que pasa entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo en función del tiempo. (Fig. 11).

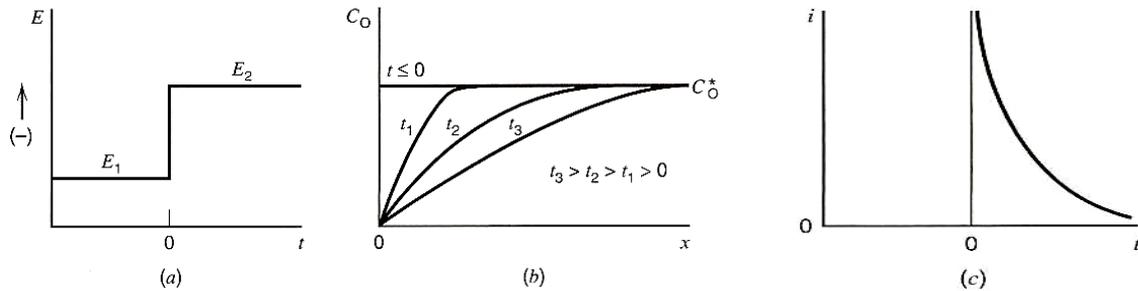


Fig. 11 a) Salto de potencial, b) Perfiles de concentración, c) Respuesta  $i$  vs  $t$ .

Para el potencial  $E_1$  se selecciona un valor en el que no exista corriente faradaica y  $E_2$  será un potencial donde la reacción de transferencia de carga {7} es extremadamente rápida y el proceso estará controlado por la transferencia de masa, es decir, por difusión. (3)



El salto de potencial entre  $E_1$  y  $E_2$  produce, primeramente un cambio en la distribución de cargas en la interfase por lo que es necesario cargar la doble capa, y posteriormente se produce la reducción u oxidación instantánea de la especie electroactiva que está en la interfase, lo que produce una corriente inicial muy elevada. A partir de ese momento la corriente que se obtiene viene determinada por el gradiente de concentración de Ox en la superficie del electrodo,

El cálculo de la corriente de difusión ( $I_d$ ) y del perfil de concentración implica solucionar la 2ª Ley de Fick (difusión lineal).

$$\frac{\partial C_0(x, t)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 C_0(x, t)}{\partial x^2} \quad (3)$$

Bajo la condición inicial ( $C_0(x, 0) = C_0^b$ ) que expresa la homogeneidad de la disolución en  $t = 0$ , y la condición semiinfinita ( $\lim_{x \rightarrow \infty} C_0(x, t) = C_0^b$ ) confirma que

las regiones distantes de la superficie electródica no son perturbadas por el experimento a  $t = 0$ . La tercera condición ( $C_0(0,t) = 0$  para  $t > 0$ ) expresa la concentración en la superficie del electrodo después del pulso diferencial.

La solución de la ecuación diferencial (3) nos proporciona la relación entre la intensidad de corriente ( $i_c$ ) y el tiempo, es la denominada ecuación de Cottrell (4).

$$I(t) = nFAC_0^b \frac{D_0^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (4)$$

En nuestro caso esta técnica se utilizara para medir la señal analítica.

Para la deposición del níquel se utiliza **cronopotenciometría** (CP) donde la señal de excitación es una corriente que pasa entre el electrodo de trabajo respecto al electrodo de referencia en función del tiempo. (Fig. 12)

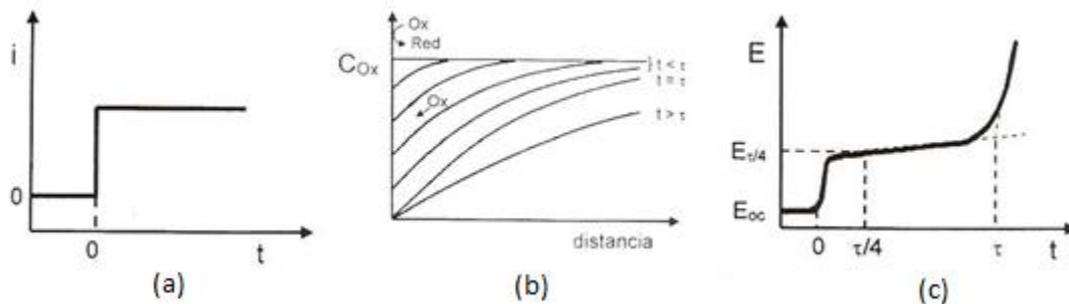


Fig. 12 a) Pulso de corriente, b) Perfiles de concentración, c) Respuesta  $E$  vs  $t$ .

Se define el tiempo de transición ( $\zeta$ ) como el tiempo que tarda en hacerse cero la concentración en la superficie del electrodo. Para tiempos menores que  $\zeta$  la concentración del  $Ni^{2+}$  caería con la distancia al electrodo y con el tiempo.

$$\frac{\partial C_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2 C_0(x,t)}{\partial x^2} \quad (5)$$

La forma del cronopotenciograma viene determinada por la concentración de Ox y de Red en la superficie del electrodo ( $x=0$ ) (Fig. 12c). Para un sistema reversible el potencial está relacionado con las concentraciones a través de la ecuación de Nerst (6).

$$E = E'_0 + 0.059 \log \frac{C_{Ox}(x = 0)}{C_{Red}(x = 0)} \quad (6)$$

Si se resuelve la ecuación diferencial en derivadas parciales, se obtiene la relación entre la intensidad de corriente y el tiempo de transición que se conoce como la ecuación de Sand (7):

$$I = \frac{nFAD_{Ox}^{1/2} \pi^{1/2} C_0^*}{2\tau^{1/2}} \quad (7)$$

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En esta sección se explican los resultados obtenidos a lo largo del trabajo y las condiciones experimentales utilizadas con más detalle. En primer lugar, se discute la optimización de la nanoestructuración y activación del SPEs con NiNP. A continuación se estudia el comportamiento analítico del sensor desarrollado para el análisis de diferentes azúcares. Por último se comprueba el funcionamiento del sensor con el análisis de un tipo de muestras reales.

## 1. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LAS ESPECIES DE INTERÉS

En primer lugar se realizaron las CV de las distintas disoluciones que se van a utilizar tanto para la nanoestructuración como para la medida de los azúcares ( $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaCl}$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ).

Como la generación de la nanoestructura de Ni se realiza a partir de una disolución de  $\text{Ni}^{2+}$ , se realiza la CV de esta disolución en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (0.1 M) y en ausencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (sólo  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaCl}$ ). Las condiciones de trabajo para realizar estas CV son: ventana de potencial de +1V a -1.2V, con una velocidad de barrido de 100mV/s y un step 10mV, el resultado obtenido fue la curva representada en la Fig. 13.

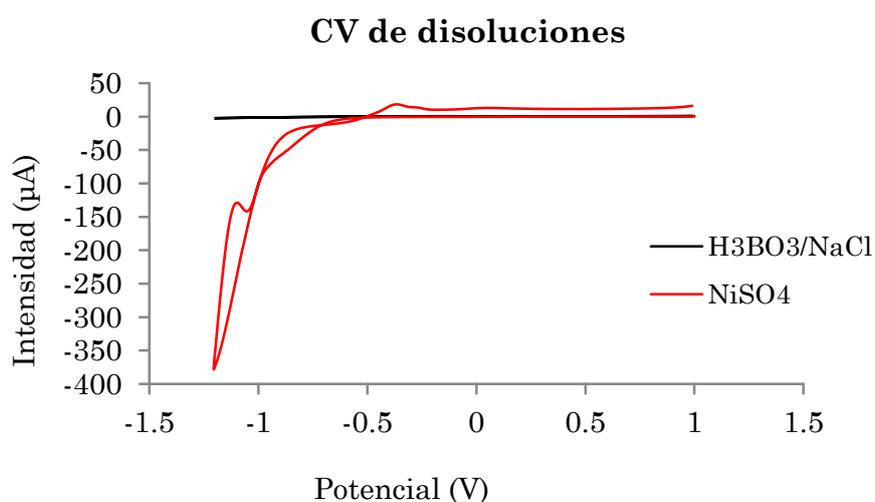
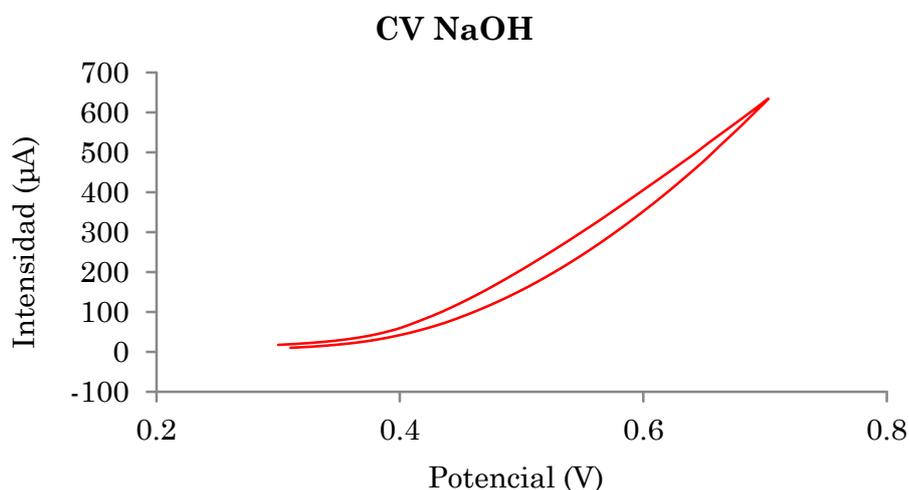


Fig. 13 CV de 0.1 M  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaCl}$

Se puede observar un proceso de reducción a potenciales más negativos que  $-1\text{V}$ , que no aparece en el blanco, por lo que se deduce que se debe a la reducción de  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Ni}^0$ . Con esta experiencia se comprueba que se puede reducir  $\text{Ni}^{2+}$  y depositar  $\text{Ni}^0$  sobre el electrodo (la superficie cambia de color debido al metal depositado) aplicando un potencial suficientemente negativo. Aunque en este trabajo la electrodeposición se va a realizar aplicando una corriente negativa por las razones explicadas anteriormente.

Si se realiza una CV de NaOH 0.1 M (buffer de medida) con un electrodo al cual se le haya depositado Ni (Fig. 14), no se observa ningún proceso electroquímico que corresponda a este metal en los potenciales de trabajo ( $+0.3$  hasta  $+0.7\text{ V}$ ).

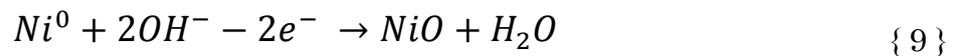
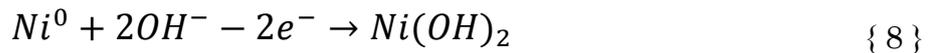


*Fig. 14 CV de NaOH sin activación.*

Este hecho es debido a que se necesita una etapa de activación para la formación de óxidos de Ni (II) que son las especies que fundamentan el sensor de azúcares que se va a desarrollar.

En algunos trabajos publicados en la bibliografía realizan la etapa de activación mediante la aplicación de un potencial muy negativo ( $-1.5\text{ V}$ ) durante un tiempo determinado, [19] [21]. En este caso, se va a realizar una activación mediante la aplicación de corrientes en lugar de potenciales.

El objetivo de esta activación es la generación de óxidos de Ni (II) en la superficie del electrodo a partir del Ni depositado. Aunque a priori pueda resultar ilógico la oxidación del metal aplicando un potencial o corrientes negativas, el proceso de oxidación que tiene lugar es un proceso químico y no electroquímico. Tras realizar la activación electroquímica, el Ni<sup>0</sup> en presencia de OH<sup>-</sup> es capaz de oxidarse espontáneamente generando diversos óxidos [22] [23], según las ecuaciones siguientes:



Tras realizar esta activación y como se puede ver en la Fig. 15, la CV de NaOH a los potenciales de trabajo muestra una señal característica de la oxidación de Ni (II) a Ni (III) a +0.39 V. Durante estas experiencias se comprobó que el potencial al que se produce este proceso se desplazaba al realizar medidas consecutivas. Este hecho podría ser debido a que la superficie de níquel fuera poco estable y evolucionara al realizar una medida. De manera que se estudió el efecto de una etapa de estabilización que consistía en realizar 50 ciclos de CV en los potenciales de trabajo (+0.3 hasta +0.7 V). Como se observa en la Fig. 15, el potencial de la oxidación del Ni (II) se desplaza hasta +0.52 V y aparece un proceso de reducción a +0.42 V que corresponde con la reducción del Ni (III) generado de nuevo a Ni (II).

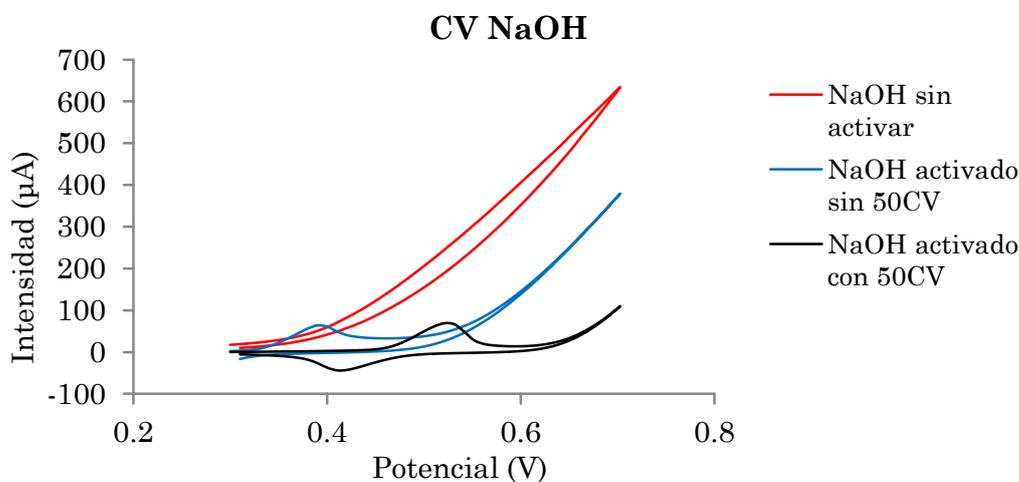


Fig. 15 Comparación de CV de NaOH (a) sin activación, (b) con activación pero sin 50CV, (c) con activación y 50CV.

El efecto de esta etapa de estabilización de la superficie se puede observar en la Fig. 16. Las curvas de la parte izquierda se corresponden con medidas consecutivas del blanco (NaOH) sin haber realizado esta etapa, y las de la parte derecha son medidas consecutivas tras haber realizado la etapa de estabilización.

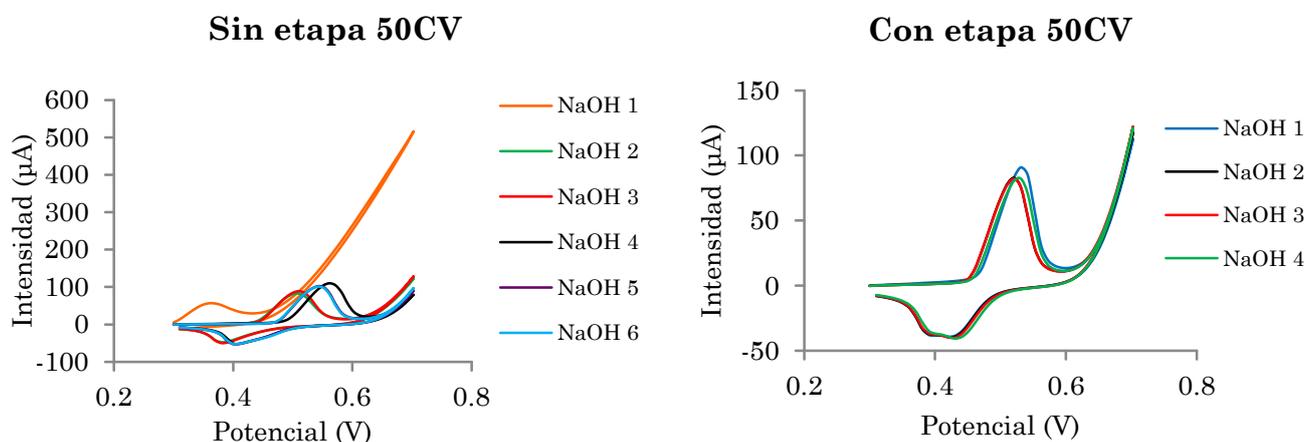


Fig. 16 Efecto de la etapa de estabilización.

Se observa de manera clara como esta etapa mejora la reproducibilidad de las medidas en el mismo electrodo ya que se evita el desplazamiento del potencial de pico, además de que se mantiene bastante constante la intensidad de la señal. Este hecho se podría entender considerando que las especies que se forman ( $\text{NiO}$  y  $\text{Ni(OH)}_2$ ) tienen una diferente estabilidad. En principio, se formaría una mezcla de estos óxidos, pero al realizar los diferentes barridos cíclicos se formaría la especie más estable, de ahí el desplazamiento a potenciales más positivos de la oxidación de  $\text{Ni(II)}$  a  $\text{Ni(III)}$ . Por tanto, se decide realizar esta etapa de estabilización para obtener unos mejores resultados en el sensor.

## **2. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE AZÚCARES REDUCTORES SOBRE NiNP-SPEs**

A continuación se estudia la respuesta del electrodo en distintas condiciones a una disolución de Glucosa de concentración 0.5 mM. En la Fig. 17 se puede observar que si se realiza la medida en un SPE de carbono sin NiNP no hay señal de Glucosa, en el momento en que se modifica el electrodo con NiNP se ve que tiene

lugar el proceso catalítico de la oxidación de la Glucosa y se aprecia una señal. Y si además se realiza la activación del Ni el pico de oxidación aumenta.

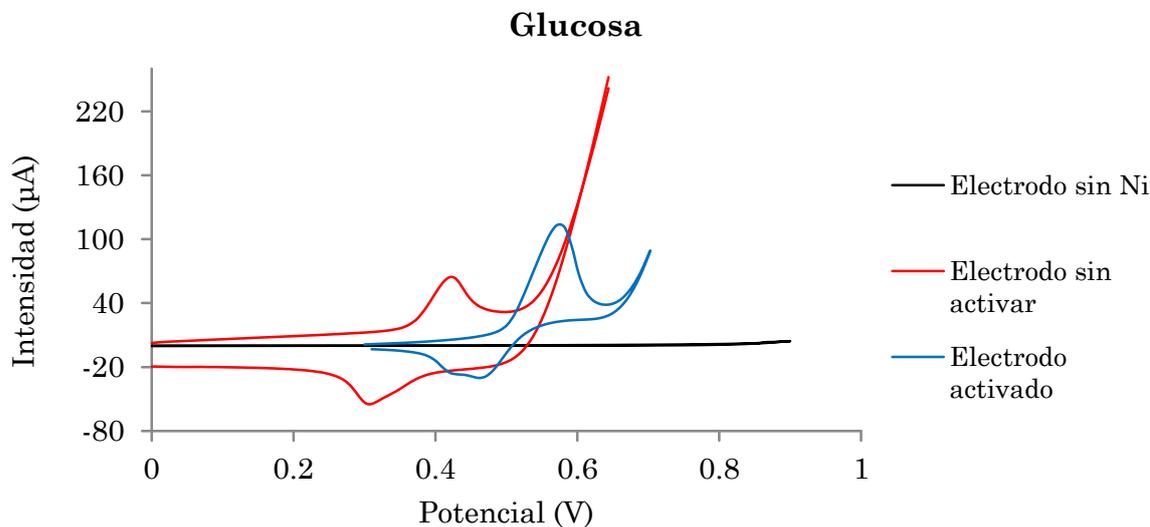
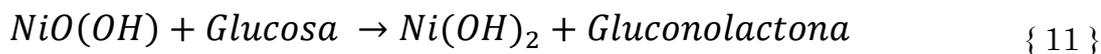
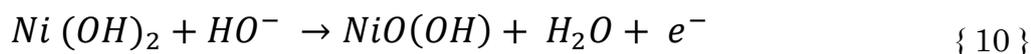


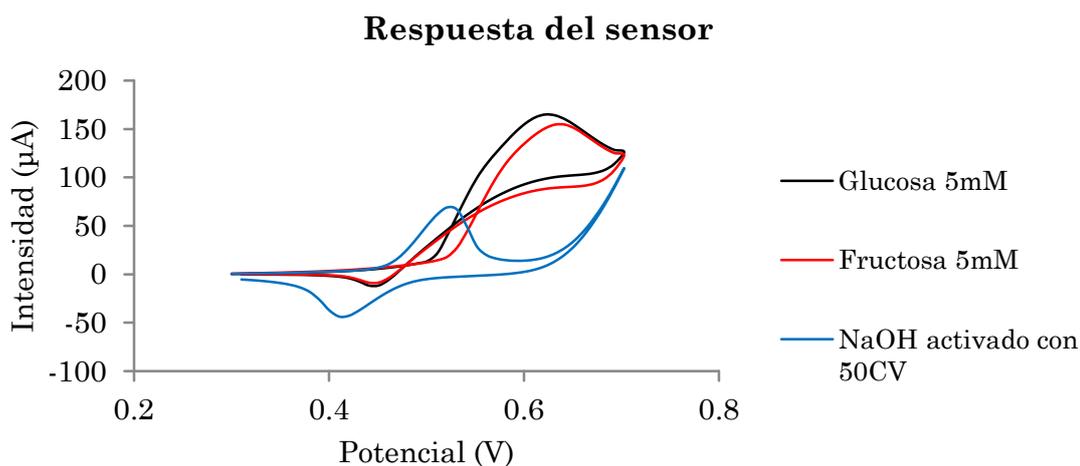
Fig. 17 Variación de la señal de Glucosa (a) SPE sin modificar, (b) SPE modificado sin activación, (c) SPE modificado con activación.

Por lo tanto el sensor fabricado con las NiNP es capaz de catalizar la reacción de oxidación de la Glucosa a Gluconolactona [18], [25] a través del par redox Ni(III)/Ni(II) según las siguientes reacciones:



La reacción {10} tiene lugar al superar un potencial positivo determinado donde el Ni (II) pasa a Ni (III), especie causante de la oxidación de la Glucosa, reduciéndose de nuevo a Ni (II) {11}. La renovación del Ni (II) es el motivo de que la corriente de oxidación aumente.

En la Fig. 18 se puede ver como el sensor además de responder a la Glucosa, lo hace a la Fructosa, y de manera similar debería responder a otros azúcares reductores capaces de ser oxidados.



*Fig. 18 Respuesta del sensor a NaOH, Glucosa y Fructosa.*

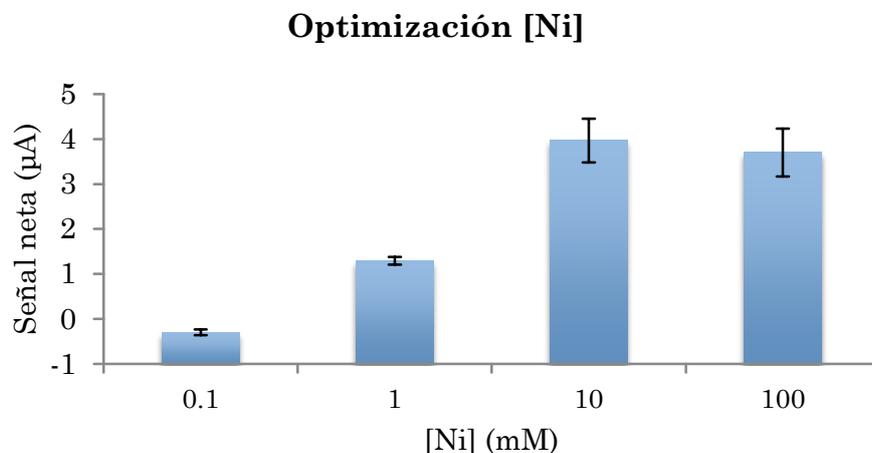
### **3. OPTIMIZACIÓN DE LA NANOESTRUCTURACIÓN CON NiNP Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE ELECTRÓDICA**

Una vez que se comprobó que con las nanopartículas de Ni se produce la catálisis de los AR, se realizó la optimización de la activación de la superficie y la nanoestructuración con NiNP.

Mediante el programa MiniTab se hizo un diseño de experimentos para realizar una optimización multivariable de las condiciones de la activación de la superficie electródica (corriente y tiempo de reducción).

De este estudio utilizando una concentración de Ni 0.1M, una intensidad de deposición de  $-50 \mu\text{A}$  y un tiempo de 60 s, mediante CP, se obtuvieron los datos para la señal analítica (Tabla. 1), concluyendo que las condiciones experimentales más adecuadas para la activación fueron de  $-100 \mu\text{A}$  como intensidad de reducción y un tiempo de 60 s, ya que son las condiciones que mayor diferencia entre señal y blanco proporcionan. La medida de la señal se llevó a cabo mediante CA a un  $E = +0.6\text{V}$  y un tiempo aprox. de 120s (cuando se estabiliza la señal). También se estudió la posibilidad de aplicar una corriente de oxidación pero los resultados no fueron tan favorables como aplicando una corriente negativa, debido a que se podría estar eliminando gran parte de las NiNP que se habían depositado anteriormente.

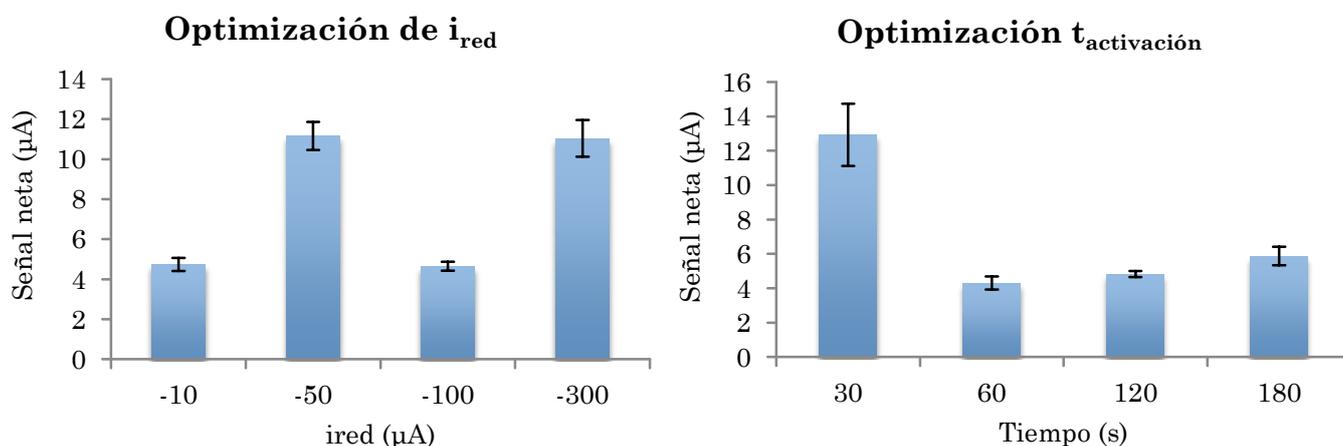
A continuación, utilizando las condiciones de activación obtenidas anteriormente se realizó la optimización de la nanoestructuración de Ni mediante una metodología univariable, optimizando factor a factor.



*Fig. 19 Optimización de la concentración de Ni para la nanoestructuración.*

Como se puede ver en la Fig. 19, la concentración que da mayor diferencia entre la señal del Blanco y la Glucosa es 10 mM de Ni (II). Para una concentración de 0.1 mM se obtiene una diferencia cercana a cero, que se puede relacionar con una baja cantidad de Ni depositado que no es capaz de producir un efecto catalítico apreciable. Los datos de esta gráfica están representados en la Tabla. 2.

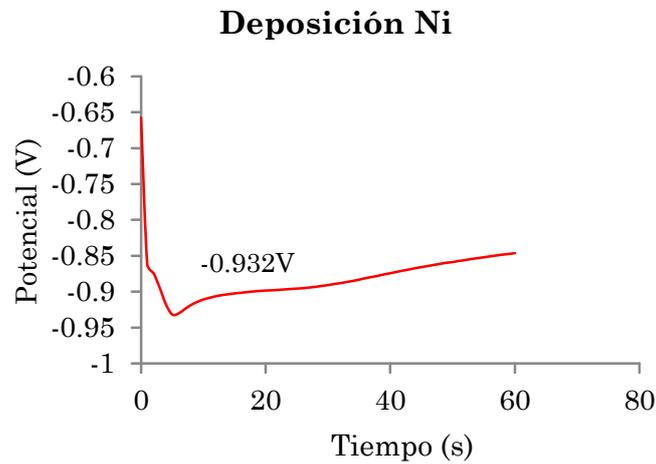
Una vez tenemos la concentración de Ni tenemos que optimizar los parámetros de la CP para la deposición de NiNP como son el tiempo y la intensidad de reducción, la señal obtenida se realiza por CA. Dando como resultado una intensidad óptima de  $-50 \mu\text{A}$  y un tiempo de activación de 30 s (Fig. 20).



*Fig. 20 Optimización del tiempo y la intensidad de reducción para la deposición de Ni.*

Los datos que se representan en estas gráficas están dados en la Tabla. 3 y Tabla. 4.

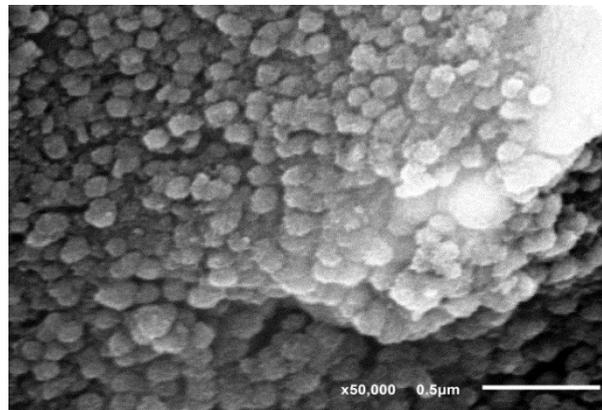
El cronopotenciograma de la deposición de las NiNP obtenido en las condiciones optimizadas es el siguiente:



*Fig. 21 Cronopotenciograma de la deposición de Ni.*

Como vemos en la Fig. 21 el potencial al que se deposita el  $\text{Ni}^0$  es  $-0.93\text{V}$ , que concuerda con los potenciales observados en la CV del  $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 13).

Con los parámetros optimizados de nanoestructuración y activación, se fabricó un sensor y se caracterizó microscópicamente mediante SEM (Fig. 22). Se puede observar las nanopartículas de Ni generadas sobre el electrodo de trabajo, calculando un diámetro aproximado de  $125\text{nm}$ .



*Fig. 22 Imagen SEM de nanopartículas de Ni.*

#### 4. OPTIMIZACIÓN DE LA CRONOAMPEROMETRÍA

El factor de la CA que se optimizó fue el potencial de oxidación aplicado para producir la reacción electrocatalítica de los azúcares, base del sensor desarrollado. A la vista de los resultados obtenidos (Tabla. 5), se empleó +0.6 V como potencial de oxidación.

#### 5. COMPORTAMIENTO ANALÍTICO DEL SENSOR

Para estudiar el rendimiento analítico del sensor desarrollado se realizaron diferentes rectas de calibrado para Glucosa, Fructosa y una mezcla de ambos.

Los calibrados se realizaron en el intervalo de concentraciones entre 10 y 10000  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la mínima concentración capaz de diferenciarse del Blanco fue de 50  $\mu\text{M}$  y el extremo superior del rango lineal fue de 1000  $\mu\text{M}$ .

Los datos obtenidos tanto para la Glucosa como para la Fructosa se muestran en la Tabla. 6 y Tabla. 7. Se realizó por triplicado y las rectas de regresión de la Fig. 23 es el promedio de los 3 electrodos.

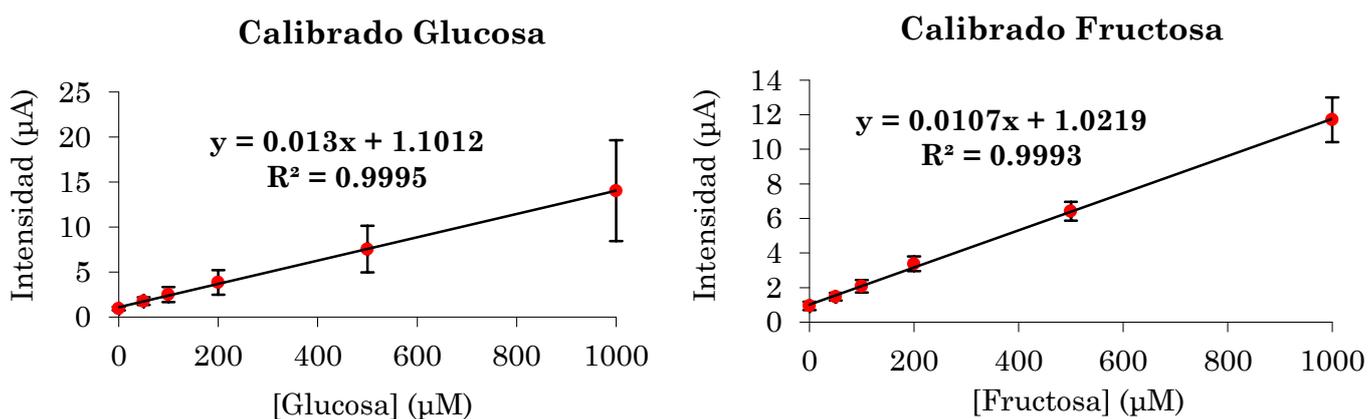


Fig. 23 Calibrado de Glucosa y Fructosa.

También se realizó un calibrado de una mezcla de ambos azúcares en una relación 1:1. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla. 8 y la gráfica en la Fig. 24.

### Calibrado Glucosa + Fructosa

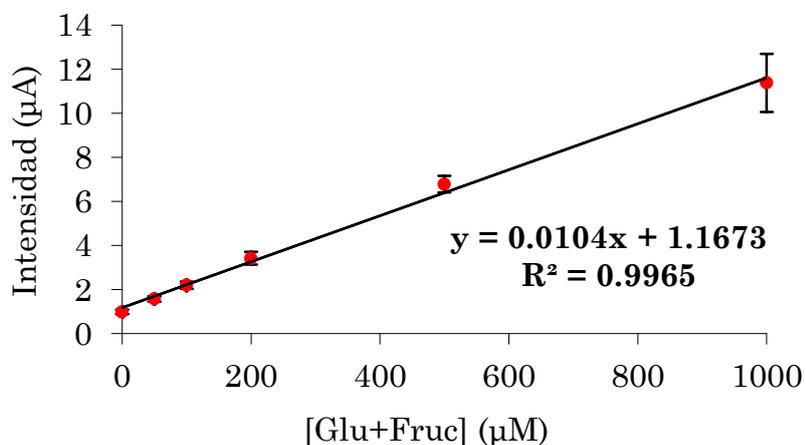


Fig. 24 Calibrado de Glucosa y Fructosa en la misma muestra.

Con los resultados obtenidos, se puede comprobar el buen comportamiento analítico del sensor para azúcares desarrollado, con un elevado rango lineal de dos órdenes de magnitud, y una mínima concentración detectable (50 µM) muy baja. Además la pendiente de los tres calibrados realizados es bastante similar por lo que se puede asegurar que el sensor responde de la misma manera a estos azúcares reductores tanto por separado como en una mezcla.

Referencia	Tipo electrodo	Rango Lineal	L.D.
[9]	NiNPs-GCE con hexa-cianoferrato (III)	1-10 µM 10-1000 µM	0.6 µM
[18]	NiNWAs	0.5-7000 µM	0.1 µM
[28]	CPEs modificado con NiO	1-110µM	0.16µM
[27]	NCGE	1-10000 µM	0.1 µM
TFM	NiNPs-SPE	50-1000 µM	16 µM

En la tabla anterior se comparan cualitativamente diferentes métodos electroquímicos para la determinación de azúcares con electrodos de níquel. El sensor desarrollado resulta competitivo respecto a otros trabajos publicados en la bibliografía.

## 6. ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD

Para realizar el estudio de la reproducibilidad dentro del mismo electrodo (repetitividad) se llevaron a cabo 6 medidas de Glucosa de concentración 500  $\mu\text{M}$ , obteniéndose los valores de la Tabla. 9. La representación gráfica es la dada en la Fig. 27. Se obtuvo en este caso un **RSD% = 2.2**.

En el caso de la reproducibilidad entre electrodos se realizó una medida de Glucosa de 500  $\mu\text{M}$  con 3 electrodos nanoestructurados diferentes, obteniéndose los valores de la Tabla. 10 y la gráfica de la Fig. 25. En este caso tenemos un valor de **RSD% = 16.5**.

A la vista de estos resultados se puede decir que la repetitividad es muy buena, en cambio la reproducibilidad entre electrodos es peor. Considerando el buen comportamiento de las medidas en el mismo electrodo, se puede deducir que la menor reproducibilidad entre electrodos podría ser debida a una diferente superficie de níquel generada sobre los electrodos, haciendo que la respuesta de los sensores fuera algo divergente. Por lo tanto, es aconsejable realizar todas las medidas con el mismo electrodo. Además este hecho puede ser una ventaja a la hora de reducir el coste del análisis.

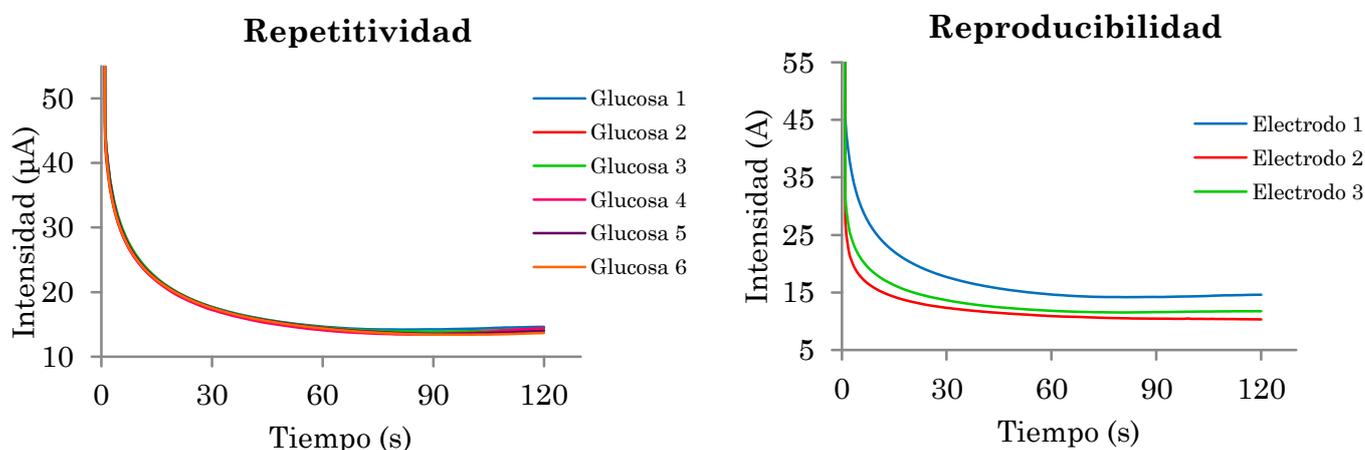


Fig. 25 Estudio de Repetitividad y Reproducibilidad.

## 7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Se realizó un estudio de estabilidad para el sensor electroquímico desarrollado. Para ello, se fabricaron varios sensores y fueron almacenados a temperatura ambiente. Para estudiar la estabilidad, se realiza un análisis de 500  $\mu\text{M}$  de Glucosa al cabo de 1, 7, 15 y 30 días desde la fabricación. Las corrientes obtenidas se proporcionan en la Tabla. 11.

Los resultados se pueden ver en la siguiente figura (Fig. 26):

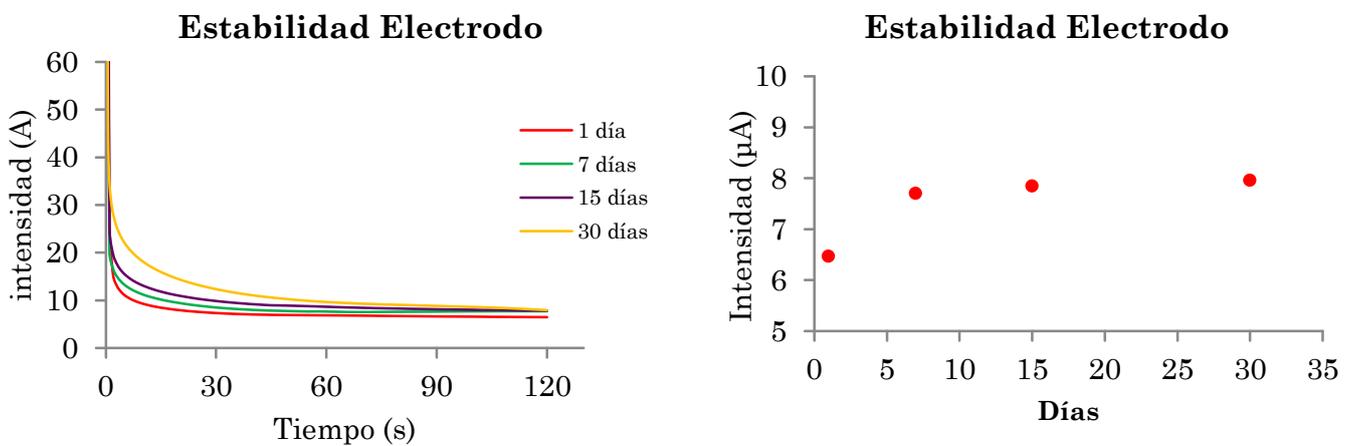


Fig. 26 Estabilidad del electrodo.

Como se observa en los resultados, la señal obtenida para los sensores aumenta ligeramente desde el día de fabricación hasta los 7 días y a partir de esa fecha se mantiene constante hasta al menos 1 mes. Probablemente, este hecho sea debido a que la superficie de níquel generada se reestructura durante los primeros días (quizás generando nuevos óxidos por acción del oxígeno del aire), aumentando la estabilidad de los sensores desarrollados.

## 8. ESTUDIO DE INTERFERENTES

Según la bibliografía [18] la principal interferencia que puede tener los azúcares en muestras de alimentos (objetivo del trabajo) es el AA, que por lo general está en concentraciones mucho más bajas que los azúcares. Por eso para determinar si el AA interfiere en la señal analítica se realizó una mezcla con Glucosa en relación 1:10 (AA : Glu).

Se observó que no hay interferencia, ya que la señal de Glucosa 500  $\mu\text{M}$  fue de 5.972  $\mu\text{A}$ , y la muestra de Glucosa 500  $\mu\text{M}$  con 50  $\mu\text{M}$  de AA dio una intensidad de 6.067  $\mu\text{A}$  (se muestra en la Fig. 27).

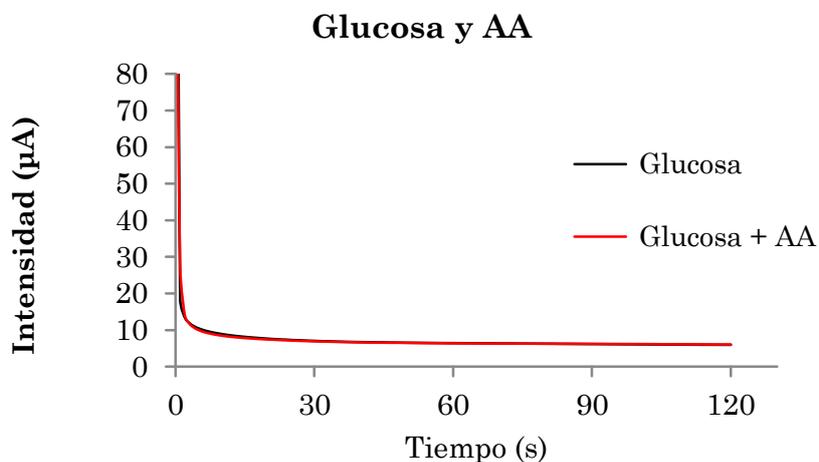


Fig. 27 Señal de Glucosa y Glucosa + AA.

## 9. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Se llevó a cabo el análisis de muestras reales de Miel por el método de adiciones estándar, tras realizar los pretratamientos explicados en el apartado VI.5.

Las adiciones estándar fueron las siguientes:

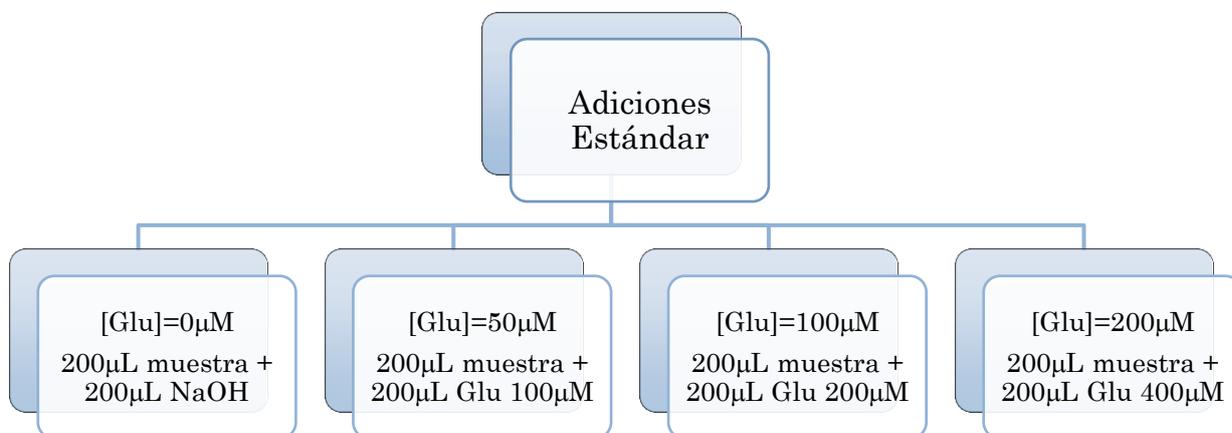


Fig. 28 Adiciones estándar para la muestra.

Las señales obtenidas son las que aparecen en la Fig. 29.

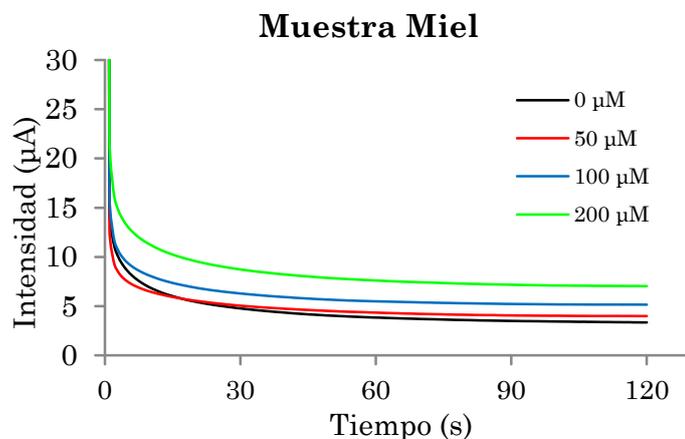


Fig. 29 Gráficas de CA de la muestra.

La recta de adiciones estándar obtenida se presenta en la Fig. 30, y los datos de la misma en la Tabla. 12.

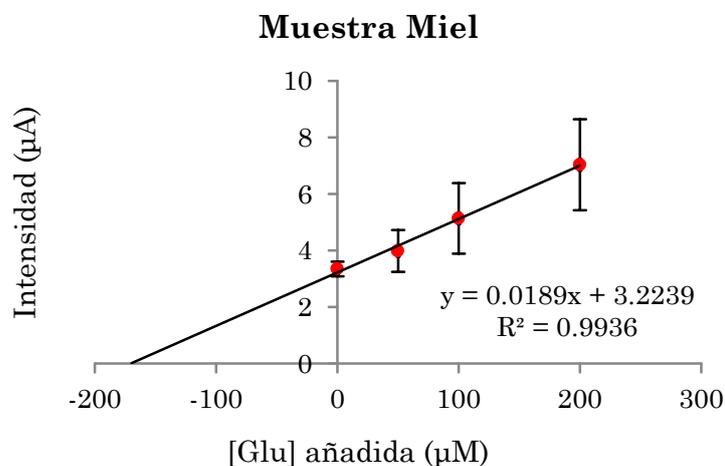


Fig. 30 Recta de adición estándar para la muestra.

Según los resultados obtenidos, teniendo en cuenta las diluciones y el peso molecular medio de los azúcares de interés (180 g/mol) obtenemos una concentración de: **64.2 ± 15.6 g/100 g** (etiqueta: 78 g /100 g). El error entre el valor obtenido por el sensor y el etiquetado es **17.7%**, teniendo en cuenta los valores medios. Esta diferencia puede deberse a dos factores, por un lado la reproducibilidad entre electro-

dos no permite obtener valores medios más precisos, y por otro lado pudiera ser que los alimentos tuvieran otro tipo de azúcares minoritarios, a los que el sensor no respondiera. Los datos obtenidos para estas mismas muestras en un estudio publicado por nuestro grupo de investigación [24] muestran que la suma de Glucosa y Fructosa en miel es de 66 g/100 g, valor más cercano al obtenido por el sensor desarrollado en este trabajo.

Si se utiliza el calibrado de la mezcla de Glucosa y Fructosa de la Fig.24, tomando el dato de la muestra que no tiene ninguna adición de Glucosa se tiene el siguiente resultado: **66.1 ± 16.5 g/100 g**. Como se puede ver la concentración medias dadas en este caso se aproximan más a las teóricamente esperadas (etiqueta), quizás tras el pretratamiento de muestra realizado los efectos de matriz se minimizan.

## **VIII. CONCLUSIONES**

Las conclusiones del trabajo son las siguientes:

— Se ha desarrollado una novedosa, simple y barata metodología para la nanoestructuración de electrodos serigrafiados con nanopartículas de níquel mediante electrodeposición.

— Gracias al efecto catalítico de los óxidos de níquel hacia los azúcares reductores, se ha fabricado y optimizado un sensor electroquímico para el análisis de estos azúcares.

— El sensor desarrollado presenta un alto rango lineal (50-1000  $\mu\text{M}$ ) con bajos límites de detección.

— Se demostró que el principal interferente (AA) de los azúcares en muestras de alimentos no afecta al comportamiento del sensor.

— A la vista de la alta reproducibilidad de las medidas en el mismo electrodo, este sensor se va a aplicar en un sistema FIA para análisis continuos de azúcares.

— La menor reproducibilidad entre electrodos podría ser mejorada con un estudio más en profundidad de las condiciones de nanoestructuración y activación de la superficie, que por falta de tiempo no pudo ser realizado.

— El sensor fue aplicado a muestras reales obteniendo resultados aceptables.

## **IX. FUTUROS PROYECTOS**

Una vez optimizado el electrodo y ver que responde correctamente a los azúcares se intentará aplicar lo realizado en este trabajo a un sistema FIA en el que el objetivo será realiza análisis en continuo, es decir, al detector le llega continuamente la f.m, que en este caso sería NaOH 0.1 M, y en el momento en que se inyecta la muestra cada cierto tiempo, se obtendrá un señal en forma de pico debido al aumento de corriente por la oxidación de la glucosa con las NiNP, con las que está modificado el electrodo. Se aplicará un potencial constante de +0.6 V, potencial optimizado en este trabajo, que es capaz de producir la oxidación mencionada.

Debido a que el sensor desarrollado admite realizar varias medidas continuas en el mismo dispositivo sería una ventaja para aplicar este sistema FIA.

## **X. REFERENCIAS**

- [1] Aleksandra Szymborska-Kajane, Anna Psurek, Robert Hese, Krzysztof Strojek, "Self-monitoring of food glucose and type 2 diabetes", *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 86, n° 1, pp. S49-S52, 2009.
- [2] Tollens, B.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 41, 1788 (1908).
- [3] Benedict, S. B., *J. Bkl. Chern.* 5, 485 (1908)
- [4] G.L. Miller. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Anal. Chem.* (1959). 31(3). Pag. 426-428.
- [5] Malik, BH. Cote, GL Real-time Dual Wavelength "Polarimetry for Glucose Sensing". *Optical Diagnostics and Sensing IX*. 7186.(2009),
- [6] Derek Horton, Jon S. Jewell, Kerstin D. Philips. *J. Org. Chem.* (1966). 31 (12). Pag. 4022-4025.
- [7] Jansen, Ch.: "New Developments in HPLC of Carbohydrates Mono-and Disaccharides". *Chemical Abstract, Labor Praxis*, 13(1/2), 56. Pag.58-60. (1989). Section: 80.
- [8] Skoog, Holler, Nieman. "Principios de Análisis Instrumental". 5ª Edición. Capítulo 28. Pag.785-830.
- [9] A.A Saei, P. Nakafi-Marandi, A. Abhari, M.d.l Guardia, J.E Nazhad Dolatabadi. "Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles". *Trends in Analytical Chemistry*. (2012)
- [10] Daniel R. Thévenot, Klara Toth, Richard A. Durst, George S. Wilson. "Electro-chemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosensors & Bioelectronics*. 16. (2001). Pag.121-131.
- [11] Pablo Fanjul-Bolado, David Hernández-Santos, Pedro José Lamas-Ardisana, Alberto Marín-Pernía, Agustín Costa-García. "Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes". *Electrochimica Acta*. 53. (2008). Pag. 3635-3642.
- [12] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento, L. Angnes "Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks" *Electrochimica Acta* 43(23) (1998) Pag.3459–3465

- [13] Lyndsey Mooring, Nikolaos G. Karousos, Callum Livingstone, James Davis, Gregory G. Wildgoose, Shelley J. Wilkins, Richard G. Compton. "Evaluation of a novel pad printing technique for the fabrication of disposable electrode assemblies". *Sensors and Actuators B*. 107. (2005). Pag. 491-496.
- [14] O. Domínguez Renedo, M.A Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez. "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications". *Talanta*. 73. (2007). Pag. 202-219.
- [15] Fang Wang, Shengshui Hu. "Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles". *Microchim. Acta*. 16S. (2009). Pag. 1-22.
- [16] Feldheim, D.L, Colby, A.F.Jr. "Metal Nanoparticles. Synthesis, characterization and applications". Washington. (2002). Ed. Press Taylor & Francis Group. Cap. 2. Pag. 17-21.
- [17] F.Nasirpouri, S.J. Bending, L.M. Teter, H. Fangohr. "Electrodeposition and magnetic properties of three-dimensional bulk and Shell nickel mesostructures". *Thin Solid Films*. 519. (2011). Pag. 8320-8325.
- [18] L.-M. Lu, L. Zhang, F.-L. Qu, H.-X. Lu, X.-B. Zhang, Z.-S. Wu, et al. "A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: Enhancing sensitivity through a nanowire array strategy". *Biosensors and Bioelectronics*. 25. (2009). Pag. 218-223.
- [19] M. García, A. Escarpa, "Disposable electrochemical detectors based on nickel nanowires for carbohydrate sensing". *Biosens. Bioelectron*. 26 (2011). Pag. 2527-2533.
- [20] Biscay, E.C. Rama, M.B.G. García, J.M.P. Carrazón, A. Costa-García. "Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes". *Electroanalysis*. 23 (2011). Pag. 209–214.
- [21] M. García, A. Escarpa. "A class-selective and reliable electrochemical monosaccharide index in honeys, as determined using nickel and nickel-copper nanowires". *Anal. Bioanal. Chem*. 402 (2012). Pag. 945–953.
- [22] Wang, J., Chen, G. and Chatrathi, M. (2004). "Nickel Amperometric Detector Prepared by Electroless Deposition for Microchip Electrophoretic Measurement of Alcohols and Sugars". *Electroanalysis*. 16: Pag. 1603–1608.

- [23] C. Zhao, C. Shao, M. Li, K. Jiao. "Flow-injection analysis of glucose without enzyme based on electrocatalytic oxidation of glucose at a nickel electrode". *Talanta*. 71 (2007). Pag. 1769–1773.
- [24] J. Biscay, E. Costa Rama, M.B. González García, A. Julio Reviejo, J.M. Pingarrón Carrazón, A. Costa-García, et al. "Amperometric fructose sensor based on ferrocyanide modified screen-printed carbon electrode", *Talanta*. 88 (2012).Pag. 432–438.
- [25] Nadeem A. Choudhry, Craig E. Banks. "Electrolytically fabricated nickel microrods on screen printed electrodes: Electro-catalytic oxidation of alcohols". *Anal. Methods*. (2011). 3. Pag. 74-77.
- [26] Pifang F. Luo, Theodore Kuwana, Dilip K. Paul, Peter M.A. Sherwood. "Electrochemical and XPS Study of the Nickel-Titanium Electrode Surface". *Anal. Chem*. (1996). 68. Pag. 3330-3337.
- [27] Ying Mu, Dongling Jia, Yayun He, Yuqing Miao, Hai-Long Wu. "Nano nickel oxide modified non-enzymatic glucose sensors with enhanced sensitivity through an electrochemical process strategy at high potential". *Biosensors and Bioelectronics* 26. (2011). Pag. 2948–2952.
- [28] M. Yousef Elahi, H.Heli, S.Z. Bathaie, M.F Mousavi. "Electrocatalytic oxidation of glucose at a Ni-Curcumin modified glassy carbon electrode". *J Solid State Electrochem*. (2007). 11. Pag. 273-282.
- [29] Tianyan You, Osamu Niwa, Zilin Chen, Katsuyoshi Hayashi, Masato Tomita, Shigeru Hirono. "An Amperometric Detector Formed of Highly Dispersed Ni Nanoparticles Embedded in a Graphite-like Carbon Film Electrode for Sugar Determination". *Anal. Chem*. (2003). 75. Pag. 5191-5196.
- [30] Yang Liu, Hong Teng, Haoqing Hou, Tianyan You. "Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode". *Biosensors and Bioelectronics*. 24. (2009). Pag. 3329-3334.
- [31] I. Molnár-Perl. "Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food". *Journal of Chromatography A*. 891. (2000). Pag. 1-32.

## **XI. ANEXO**

En el presente Anexo se presentan las diferentes tablas que se indican a lo largo del trabajo:

	<b>-5<math>\mu</math>A,60s</b>	<b>-5<math>\mu</math>A,300s</b>	<b>-52.5<math>\mu</math>A,180s</b>	<b>-100<math>\mu</math>A,60s</b>	<b>-100<math>\mu</math>A,300s</b>	<b>Sin activación</b>
Glucosa	4.915 $\mu$ A	5.535 $\mu$ A	5.193 $\mu$ A	12.013 $\mu$ A	4.264 $\mu$ A	3.495 $\mu$ A
Blanco	0.581 $\mu$ A	0.867 $\mu$ A	0.863 $\mu$ A	0.945 $\mu$ A	1.33 $\mu$ A	0.494 $\mu$ A
Diferencia	4.334 $\mu$ A	4.668 $\mu$ A	4.330 $\mu$ A	<b>11.068 <math>\mu</math>A</b>	2.934 $\mu$ A	3.001 $\mu$ A

Tabla. 1 Optimización de la activación superficial.

<b>[Ni]</b>	<b>0.1mM</b>	<b>1mM</b>	<b>10mM</b>	<b>100mM</b>
Glucosa	1.276 $\mu$ A	2.805 $\mu$ A	5.182 $\mu$ A	5.661 $\mu$ A
Blanco	1.576 $\mu$ A	1.509 $\mu$ A	1.216 $\mu$ A	1.959 $\mu$ A
Diferencia	-0.300 $\mu$ A	1.29 $\mu$ A	<b>3.966 <math>\mu</math>A</b>	3.702 $\mu$ A
Desviación	-0.064	0.085	<b>0.487</b>	0.534

Tabla. 2 Optimización de la concentración de Ni (II).

<b><math>i_{red}</math></b>	<b>-10<math>\mu</math>A</b>	<b>-50<math>\mu</math>A</b>	<b>-100<math>\mu</math>A</b>	<b>-300<math>\mu</math>A</b>
Glucosa	6.683 $\mu$ A	13.82 $\mu$ A	7.358 $\mu$ A	14.107 $\mu$ A
Blanco	1.951 $\mu$ A	2.662 $\mu$ A	2.707 $\mu$ A	3.066 $\mu$ A
Diferencia	4.732 $\mu$ A	<b>11.158 <math>\mu</math>A</b>	4.651 $\mu$ A	11.041 $\mu$ A
Desviación	0.328	<b>0.698</b>	0.220	0.912

Tabla. 3 Optimización de la intensidad de reducción del Ni (II).

<b>t(s)</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>180</b>
Glucosa	14.57 $\mu$ A	5.567 $\mu$ A	7.022 $\mu$ A	8.171 $\mu$ A
Blanco	1.644 $\mu$ A	1.263 $\mu$ A	2.200 $\mu$ A	2.293 $\mu$ A
Diferencia	<b>12.926 <math>\mu</math>A</b>	4.304 $\mu$ A	4.822 $\mu$ A	5.878 $\mu$ A
Desviación	<b>1.812</b>	0.374	0.173	0.532

Tabla. 4 Optimización del tiempo de reducción de Ni (II).

<b><math>E_{ox}</math> (V)</b>	<b>Intensidad (<math>\mu</math>A)</b>	
	<b>Glucosa</b>	<b>Blanco</b>
0.4	0.89	0.08
0.5	4.11	0.20
<b>0.6</b>	<b>18.23</b>	<b>0.76</b>
0.7	67.96	33.34

Tabla. 5 Optimización de la intensidad de oxidación.

[Glu] ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
0	$0.92 \pm 0.18$
50	$1.76 \pm 0.43$
100	$2.48 \pm 0.84$
200	$3.84 \pm 1.38$
500	$7.54 \pm 2.59$
1000	$14.04 \pm 5.60$

*Tabla. 6 Calibrado de Glucosa.*

[Fruc] ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
0	$0.94 \pm 0.23$
50	$1.47 \pm 0.22$
100	$2.08 \pm 0.36$
200	$3.38 \pm 0.42$
500	$6.42 \pm 0.54$
1000	$11.71 \pm 1.30$

*Tabla. 7 Calibrado de Fructosa.*

[Glu+Fruc] ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
0	$0.98 \pm 0.10$
50	$1.57 \pm 0.12$
100	$2.19 \pm 0.17$
200	$3.42 \pm 0.28$
500	$6.78 \pm 0.38$
1000	$11.38 \pm 1.32$

*Tabla. 8 Calibrado de Glucosa y Fructosa conjunto.*

Medida	Intensidad
1	14.19
2	13.78
3	13.83
4	13.43
5	13.53
6	13.40
<b>Media</b>	<b>13.69</b>
<b>Desviación</b>	<b>0.30</b>
<b>RSD %</b>	<b>2.20</b>

*Tabla. 9 Repetitividad.*

Electrodo	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
1	14.19
2	10.32
3	11.53
<b>Media</b>	<b>12.01</b>
<b>Desviación</b>	<b>1.98</b>
<b>RSD %</b>	<b>16.48</b>

*Tabla. 10 Reproducibilidad.*

Días	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
1	6.467
7	7.703
15	7.849
30	7.961

*Tabla. 11 Estabilidad del electrodo.*

[Glu] añadida ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad ( $\mu\text{A}$ )
0	$3.35 \pm 0.25$
50	$3.99 \pm 0.74$
100	$5.14 \pm 1.25$
200	$7.04 \pm 1.61$

*Tabla. 12 Muestra de Miel.*