



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Development of electrochemical sensors based on
nanostructured carbon materials for health-care
applications

Alejandra Abellán Llobregat



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departamento de Química Física
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Instituto Universitario de Materiales

Facultad de Ciencias

Development of electrochemical sensors based on nanostructured carbon materials for health-care applications

Alejandra Abellán Llobregat

Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTOR por la Universidad de Alicante con
MENCIÓN DE DOCTOR INTERNACIONAL

DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES

Dirigida por:

Emilia Morallón Núñez
Catedrática de Universidad
Departamento de Química Física

Lorena Vidal Martínez
Profesora contratada doctora en
Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología

EMILIA MORALLÓN NÚÑEZ, Catedrática de Universidad del departamento de Química Física y LORENA VIDAL MARTÍNEZ, Profesora contratada doctora del departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, ambos de la Universidad de Alicante.

CERTIFICAN QUE:

Dña. **Alejandra Abellán Llobregat**, Licenciada en Química, ha realizado en el Grupo de Electrocatalisis y Electroquímica de Polímeros, del Departamento de Química Física y en el Grupo de Espectroscopía Atómica-Masas y Química Analítica en condiciones extremas, del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, ambos grupos pertenecientes al Instituto Universitario de Materiales de Alicante, bajo nuestra dirección, el trabajo que lleva por título: ***Development of electrochemical sensors based on nanostructured carbon materials for health-care applications***, que constituye su memoria para aspirar al grado de doctora, reuniendo, a nuestro juicio, las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Alicante a 26 enero de 2017.

Emilia Morallón Núñez
Catedrática de Universidad
Departamento de Química Física

Lorena Vidal Martínez
Profesora contratada doctora
Departamento de Química Analítica, Nutrición
y Bromatología



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mi pequeña princesa, mi pequeña Noa



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mi gran gigante, mi valiente abuelo

Parece que fue ayer cuando comenzaba un Doctorado en Electroquímica, y sin embargo ya han pasado tres años. Tres años de aprendizaje, no solo sobre electroquímica sino también sobre mí misma, de viajes, de cafés que se convierten en cervezas, tres años de ciencia que se confunden con amistad. Tres años que me han dado tantas oportunidades, que lo menos que puedo hacer es agradecer a todas aquellas personas que han hecho esta aventura posible.

Quiero agradecer en primer lugar, y muy especialmente a mis directoras de Tesis, la Dra. Emilia Morallón y la Dra. Lorena Vidal por darme la oportunidad de aprender de ellas, por sus consejos, su paciencia y porque gracias a sus aportaciones, ahora la Electroquímica tiene más de Química Analítica.

A la Generalitat Valenciana, por la beca concedida para llevar a cabo esta Tesis Doctoral (Prometeo2013/038).

A todos los compañeros del Grupo de Electrocatalisis y Electroquímica de Polímeros (GEPE), los que están y los que ya se fueron, por hacer más amenos estos tres años. Especialmente agradecer a mis compañeros de Planta Piloto, Andrés y Edwin, por alegrarme estos últimos meses de escritura. A Toya, por estar siempre pendiente de todo con esa eficiencia que le caracteriza. A Javier Medina, por su enorme ayuda a lo largo de estos tres años, por dejar que me desahogara cuando las cosas no iban del todo bien en el destierro.

Al grupo de Espectroscopía atómica-masas y Química Analítica en condiciones extremas, especialmente al Dr. Antonio Canals, por el apoyo

recibido durante este largo camino y por el sincero aprecio que me ha mostrado siempre. Él sabe que ese sentimiento es correspondido.

Una mención especial se merecen mis compañeros y amigos Jose Quintero, Carolina González, Andrea Olivares, Ricardo Martínez y Héctor Torregrosa, porque esta Tesis no habría sido posible sin el sudor de su frente. Gracias por estar siempre dispuestos a dejarme analizar vuestras muestras biológicas.

Me gustaría agradecer al catedrático Rafael Rodríguez Amaro y a todos los compañeros del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba, algunos de ellos ya amigos, por hacerme sentir como en casa durante el tiempo que pasé con ellos.

I would also like to thank Joseph Wang and Nanoengineering Research Group for their contribution to my experience. Special thanks to my colleagues, Itthipon Jeerapan, my “supervisor”, and Cristian Silva for their enormous help and for all they did to make me happy. I will never forget the great moments we spent together in San Diego.

Y sobre todo a mi familia, especialmente a mis padres, que me enseñaron a luchar por conseguir aquello que quería, a nunca abandonar mis sueños, por difíciles de alcanzar que fueran. A mi hermana, por esa alegría innata que contagia allí donde va, que te hace incluso olvidar lo agobiada que está una cuando está escribiendo una tesis.

Y especialmente a Ricardo, un millón de gracias por todo tu apoyo, por tu inmensa paciencia, por mantener siempre la calma, por los momentos de

lectura, por los romanos, por los viajes, por todo lo que me has enseñado y por todo lo que me queda por aprender a tu lado.

Finalmente, agradecer a todas esas personas que han contribuido a mi formación, tanto personal como profesional, ya que me voy con la sensación de haber superado con creces los objetivos que me propuse al comienzo de esta aventura.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Índice general

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS.....	I
GLOSARIO DE PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	VII

RESUMEN/SUMMARY

Resumen.....	1
Summary.....	3

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

1. Introducción	9
2. Objetivos de la Tesis Doctoral	9
3. Estructura de la Tesis Doctoral.....	10

CAPÍTULO 1

Introducción general

1. Sensores y biosensores electroquímicos.....	23
1.1. Interés en el desarrollo de sensores y biosensores.....	23
1.2. Definición y fundamentos	24
1.3. Materiales empleados como electrodos (transductores)	28
1.4. Aplicaciones	29
2. Materiales carbonosos	29
2.1. Enlaces C-C y formas alotrópicas del carbono.....	29
2.2. Grafito.....	31
2.3. Grafeno	32
2.4. Óxido de grafeno	35
2.5. Nanotubos de carbono	37
2.6. Funcionalización de materiales carbonosos.....	40
2.6.1. Funcionalización química de materiales carbonosos	41
2.6.2. Funcionalización electroquímica de materiales carbonosos.....	44
2.7. Materiales carbonosos nanoestructurados en sensores y biosensores.....	47
3. Analitos de interés clínico estudiados.....	49

3.1. Ácido ascórbico.....	49
3.1.1. Características generales del ácido ascórbico	49
3.1.2. Determinación de AA mediante métodos no electroquímicos.....	52
3.1.3. Determinación de AA mediante métodos electroquímicos	52
3.2. Ácido úrico.....	54
3.2.1. Características generales del ácido úrico	54
3.2.2. Determinación de UA mediante métodos enzimáticos	56
3.2.3. Determinación de UA mediante métodos electroquímicos.....	58
3.3. Glucosa	59
3.3.1. Características generales de la glucosa	59
3.3.2. Biosensores electroquímicos de glucosa.....	61
3.3.3. Sensores electroquímicos de glucosa.....	64
4. Bibliografía.....	67

CAPÍTULO 2

Técnicas y métodos experimentales

1. Introducción	91
2. Materiales y reactivos	91
2.1. Reactivos.....	91
2.2. Materiales carbonosos	93
2.3. Electroodos empleados	93
2.4. Muestras reales	94
3. Técnicas de caracterización.....	95
3.1. Técnicas electroquímicas.....	95
3.1.1. Introducción.....	95
3.1.2. Protocolo de limpieza	98
3.1.3. Voltamperometría cíclica.....	99
3.1.4. Cronoamperometría	101
3.2. Técnicas microscópicas	103
3.2.1. Introducción.....	103
3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	104
3.2.3. Microscopía electrónica de barrido.....	106
3.2.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo	107
3.3. Técnicas espectroscópicas de análisis de superficies.....	108
3.3.1. Introducción.....	108
3.3.2. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X	110
3.3.3. Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía	112

3.4. Técnicas de tratamiento térmico	113
3.4.1. Introducción.....	113
3.4.2. Desorción a temperatura programada.....	113
4. Métodos para la evaluación de la calidad de las medidas	115
4.1. Estadística de medidas repetidas	115
4.1.1. Media y desviación estándar	115
4.1.2. Intervalo de confianza de la media.....	116
4.2. Validación del método: métodos de calibración.....	117
4.2.1. Calibración externa	117
4.2.2. Método de adición de estándar	120
4.2.3. Análisis de muestras reales.....	121
4.3. Validación del método: parámetros analíticos.....	124
4.3.1. Sensibilidad	124
4.3.2. Límite de detección y límite de cuantificación	125
4.3.3. Intervalo lineal e intervalo de trabajo	126
4.3.4. Exactitud: veracidad y precisión	126
5. Preparación de materiales	128
5.1. Preparación de dispersiones acuosas de grafeno (Gr-FMN).....	128
5.2. Síntesis de óxido de grafeno.....	130
5.3. Funcionalización de materiales carbonosos.....	131
5.3.1. Funcionalización electroquímica de hCNTs con ácido 4-aminobenzoico.....	131
5.3.2. Funcionalización química.....	132
6. Referencias	136

CHAPTER 3

FMN-graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid

1. Introduction.....	141
2. Experimental	144
2.1. Reagents and equipment	144
2.2. Preparation of graphene modified electrodes.....	145
2.3. Electrochemical methods	146
3. Results and discussion.....	147
3.1. Modified electrode characterization.....	147
3.2. Electrochemical behavior of AA and UA.....	150
3.3. Electrochemical determination of UA in the presence of AA	155

4. Conclusions.....	162
5. References.....	163

CHAPTER 4

Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped GO for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid in urine samples

1. Introduction.....	169
2. Experimental	172
2.1. Reagents and equipment	172
2.2. Preparation of GO decorated with Au-NPs	174
2.2.1. Synthesis and purification of GO decorated with Au-NPs.....	174
2.2.2. Graphene oxide dispersions	175
2.3. Preparation of Au-IDA modified electrodes	175
2.4. Electrochemical methods	176
3. Results and discussion.....	178
3.1. Au-GO/Au-IDA electrodes characterization	178
3.1.1. Electrochemical characterization	178
3.1.2. Structural characterization	179
3.2. Electrochemical determination of AA and UA on Au-GO/Au-IDA electrodes.....	181
3.3. Simultaneous detection of AA and UA.....	185
3.4. Study of other interferences	189
3.5. Human urine samples.....	191
4. Conclusions.....	192
5. References.....	193

CHAPTER 5

Successful determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids by an electrochemical and portable sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes

1. Introduction.....	201
2. Experimental	204
2.1. Reagents and equipment	204
2.2. Preparation of sensors	205
2.2.1. Electrochemical functionalization of hCNTs with 4-ABA.....	205
2.2.2. Functionalized hCNTs dispersion.....	206

2.2.3. Preparation of modified electrodes	206
2.3. Electrochemical methods	207
3. Results and discussion	209
3.1. Material characterization	209
3.2. Voltammetric behavior towards AA and UA oxidation	213
3.2.1. Individual quantification of AA and UA	213
3.2.2. Simultaneous quantification of AA and UA	216
3.3. Chronoamperometric behavior towards AA and UA determination.....	221
3.3.1. Individual determination of AA and UA.....	221
3.3.2. Evaluation of interferences	224
3.4. Real samples	230
3.4.1. Urine samples	230
3.4.2. Perspiration samples	235
3.4.3. Serum samples.....	241
3.4.4. Blood samples.....	245
4. Conclusions.....	248
5. References.....	249

CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

1. Introduction.....	259
2. Materials and methods	261
2.1. Reagents and apparatus	261
2.2. Preparation of the sensors	263
2.2.1. Pt-decorated graphite synthesis and purification	263
2.2.2. Preparation of the inks	263
2.2.3. Preparation of the sensors	264
2.2.4. Preparation of amperometric glucose biosensors	265
2.3. Electrochemical methods	266
3. Results and discussion.....	267
3.1. Pt-decorated graphite line sensors. Glucose oxidation	267
3.2. Pt-graphite line biosensors. Glucose detection.....	270
3.3. Stretchable GOx/Pt-graphite biosensor	271
3.3.1. Glucose detection in standard solutions	271
3.3.2. Human perspiration samples.....	275

4. Conclusions.....	278
5. References.....	279

ANNEX TO CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

1. Graphite and Pt-decorated graphite powder.....	285
1.1. Electrochemical characterization	285
1.2. Structural characterization.....	286
2. Electrochemical response to H ₂ O ₂ at non-enzymatic Pt-graphite electrodes.....	288
3. Pt-graphite stretchable sensor and GOx/Pt-graphite stretchable biosensor	290
3.1. Stretchability characterization	290
4. References.....	293

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales

Conclusiones	297
--------------------	-----

Índice de figuras

CAPÍTULO 1

Introducción General

<u>Figura 1.1.</u> Esquema de un sensor electroquímico.....	25
<u>Figura 1.2.</u> Esquema y componentes de un biosensor.....	26
<u>Figura 1.3.</u> Esquema de la estructura cristalina del grafeno.....	33
<u>Figura 1.4.</u> Estructura del GO formada por una parte hidrofóbica y una hidrofílica.....	36
<u>Figura 1.5.</u> Clasificación de los MWCNTs de acuerdo a su estructura: A) herringbone. B) Bamboo. C) Tubo hueco.....	38
<u>Figura 1.6.</u> Esquema de las técnicas de funcionalización de materiales carbonosos.....	42
<u>Figura 1.7.</u> Diferentes formas del AA en función del pH.....	50
<u>Figura 1.8.</u> Reacciones de oxidación del AA. A) Reacción de oxidación reversible. B) Reacción de hidrólisis irreversible. C) Reacción global irreversible.....	53
<u>Figura 1.9.</u> Reacción de oxidación del UA catalizada por la enzima uricasa.....	56
<u>Figura 1.10.</u> Reacción de oxidación de UA a alantoína a $\text{pH} \geq 6$	58
<u>Figura 1.11.</u> Isómeros de la glucosa a $\text{pH} 7.0$	60
<u>Figura 1.12.</u> Estructura de la glucosa oxidasa de <i>Aspergillus Niger</i>	62
<u>Figura 1.13.</u> Voltagrama cíclico en ausencia (línea punteada) y en presencia (línea sólida) de 0.1 M de glucosa en PBS a $\text{pH} 7.5$ mostrando las tres regiones de potencial donde la glucosa es electroquímicamente oxidada en un electrodo de Pt.....	66

CAPÍTULO 2

Técnicas y métodos experimentales

<u>Figura 2.1.</u> Esquema de la configuración de celda electroquímica de 3 electrodos.....	97
<u>Figura 2.2.</u> A) Diagrama potencial-tiempo. B) Voltamperograma típico de una especie redox en disolución.....	100

<u>Figura 2.3.</u> A) Forma de la señal para un salto de potencial en el que la especie O no es electroactiva al potencial E_1 , pero se reduce a un potencial E_2 . B) Perfil de concentración para varios tiempos. C) Representación de la intensidad de corriente frente al tiempo.....	102
<u>Figura 2.4.</u> Tipos de interacción electrón-materia.....	103
<u>Figura 2.5.</u> Esquema general de la espectroscopia de superficies. El haz puede ser de fotones, electrones, iones o moléculas neutras.....	109
<u>Figura 2.6.</u> Esquema del proceso XPS.....	110
<u>Figura 2.7.</u> Esquema del proceso EDX.....	112
<u>Figura 2.8.</u> Cálculo de la concentración de analito en una muestra problema mediante el método de adición de estándar.....	121
<u>Figura 2.9.</u> Esquema de la FMN en disolución: A) 2D. B) 3D.....	129
<u>Figura 2.10.</u> Esquema simplificado de la reacción entre grafito y FMN (Gr-FMN).....	129
<u>Figura 2.11.</u> Esquema simplificado de la síntesis de GO a partir de grafito (método de Marcano).....	131
<u>Figura 2.12.</u> Esquema correspondiente a la funcionalización electroquímica de los hCNTs con 4-ABA.....	132
<u>Figura 2.13.</u> Esquema de la síntesis de Au-NPs sobre GO (Au-GO).....	133
<u>Figura 2.14.</u> Esquema de la síntesis de Pt-NPs sobre grafito (Pt-graphite).....	135
<u>Figura 2.15.</u> Esquema de la síntesis de Pt-NPs sobre Gr-FMN (Pt-Gr-FMN).....	136

CHAPTER 3

FMN-graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid

<u>Figure 3.1.</u> Steady state voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for: A) Gr-FMN/Au-IDA electrode. B) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode.....	148
<u>Figure 3.2.</u> TEM images of Gr-FMN flakes at different magnifications.....	149
<u>Figure 3.3.</u> TEM images of Pt-Gr-FMN hybrids at different magnifications.....	149
<u>Figure 3.4.</u> Voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for successive additions of UA (A-C): A) bare Au-IDA. B) Gr-FMN/Au-IDA electrode. C) Pt/Gr-FMN/Au-IDA electrode. D) Calibration curve for UA quantification in the absence of AA obtained with Gr-FMN/Au-IDA electrode (maroon line) and with Pt-Gr-FMNS/Au-IDA electrode (green line).....	150

<u>Figure 3.5.</u> Voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for successive additions of AA (A-C): A) bare Au-IDA. B) Gr-FMN/Au-IDA electrode. C) Pt/Gr-FMN/Au-IDA electrode.....	154
<u>Figure 3.6.</u> Voltammograms obtained for: A) bare Au-IDA electrode in 3 mM AA and 87 μ M UA solutions in PBS. B) Gr-FMN/Au-IDA electrode in 250 μ M AA solution in PBS for successive additions of UA. C) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode in 250 μ M AA solution in PBS for successive additions of UA. D) Calibration curve for UA quantification in the absence of AA obtained with Gr-FMN/Au-IDA electrode (maroon line) and with Pt-Gr-FMNS/Au-IDA electrode (green line).....	156
<u>Figure 3.7.</u> Regression lines of i_{UA} vs i_{AA+UA} : A) Gr-FMN/Au-IDA electrode. B) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode.....	160

CHAPTER 4

Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped GO for the simultaneous determination of AA and UA in urine samples

<u>Figure 4.1.</u> Schematic illustration of the preparation procedure of the sensor described in this study.....	176
<u>Figure 4.2.</u> Steady state voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0).....	178
<u>Figure 4.3.</u> TEM images of: A) GO dispersion. B) Au-GO dispersion. C) Histogram of Au-NPs size.....	179
<u>Figure 4.4.</u> FESEM image for Au-GO/Au-IDA modified electrode.....	180
<u>Figure 4.5.</u> XPS spectra for Au-GO dispersion.....	181
<u>Figure 4.6.</u> Cyclic voltammograms for Au-GO/Au-IDA electrode for: A) different AA concentrations. B) Different UA concentrations.....	182
<u>Figure 4.7.</u> <i>i-t</i> curves for Au-GO/Au-IDA electrode to successive additions of: A-B) AA at 0.75 V. C-D) UA at 1.0 V in stirred PBS.....	183
<u>Figure 4.8.</u> Calibration curves for Au-GO/Au-IDA modified electrodes towards: A) AA additions. Inset: AA concentration range evaluated. B) UA additions. Data corresponding to Figure 4.7.....	183
<u>Figure 4.9.</u> Cyclic voltammograms of Au-GO/Au-IDA modified electrode for successive additions of: A) AA on a solution of UA 600 μ M. B) UA on a solution of AA 275 μ M.....	186
<u>Figure 4.10.</u> <i>i-t</i> curves obtained for the interference study of UA on: A) AA 30 μ M. B) AA 90 μ M.....	187
<u>Figure 4.11.</u> <i>i-t</i> curves obtained for the interference study of AA on: A) UA 120 μ M. B) UA 450 μ M.....	187

<u>Figure 4.12.</u> i-t curves for the interference study of 5 mM glucose, 1 μ M DP and 0.5 μ M EP on: A) AA solution (50 μ M) at 0.75 V. B) UA solution (420 μ M) at 1.0 V. $E_i = 0.5$ V.....	189
<u>Figure 4.13.</u> Inter-sensor reproducibility studied on urine sample by chronoamperometry for five electrodes at 0.95 V (black dots) and 1.2 V (red dots).....	192

CHAPTER 5

Successful determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids by an electrochemical and portable sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes

<u>Figure 5.1.</u> Schematic illustration of the proposed working configurations: A) Vertical configuration or beaker-cell. B) Horizontal configuration or drop-cell.....	207
<u>Figure 5.2.</u> TEM images of: A) hCNTs material showing the open end of the CNT. B) hCNTs-4ABA material showing the close end of the CNT.....	209
<u>Figure 5.3.</u> A-B) Steady voltammograms of: A) h-CNTs/Au-IDA. B) h-CNTs-4ABA/Au-IDA electrodes. C-D) TPD profiles for hCNTs and hCNTs-4ABA: C) evolved CO. D) Evolved CO ₂ . E) N1s XPS spectrum for hCNTs-4ABA.....	210
<u>Figure 5.4.</u> Voltammetric behavior of: A-B) hCNTs/Au-IDA electrode towards additions of: A) AA. B) UA. C-D) hCNTs-4ABA/Au-IDA towards: C) AA. D) UA. Vertical configuration.....	213
<u>Figure 5.5.</u> Voltammetric behavior of hCNTs/Au-IDA electrode in a solution that contains a mixture of AA and UA: A-B) voltammograms obtained in PBS (0.25 M, pH 7.0) and for different additions of: A) AA with a fixed UA concentration ($C_{UA} = 600$ μ M). B) UA with a fixed AA concentration ($C_{AA} = 600$ μ M). C-D: Regression lines of j_i vs j_{i+j} : C) j_{AA} vs j_{AA+UA} . D) j_{UA} vs j_{UA+AA}	217
<u>Figure 5.6.</u> Voltammetric behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in solution that contains a mixture of AA and UA: A-B) voltammograms obtained in PBS (0.25 M, pH 7.0) and for different additions of: A) AA with a fixed UA concentration ($C_{UA} = 600$ μ M). B) UA with a fixed AA concentration ($C_{AA} = 600$ μ M). C-D: Regression lines of j_i vs j_{i+j} : C) j_{AA} vs j_{AA+UA} and D) j_{UA} vs j_{UA+AA} . Vertical configuration.....	218
<u>Figure 5.7.</u> Electrochemical behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA and UA oxidation in vertical configuration: A-B) j-t curves for concentrations between 0 and 1 mM of: A) AA at 0.1 V. B) UA at 0.32 V, $E_i = 0.0$ V. C-D) calibration curves obtained for: C) AA. D) UA.....	222

<u>Figure 5.8.</u> Electrochemical behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA and UA oxidation in horizontal configuration: A-B) j-t curves for concentrations between 0 and 1 mM of: A) AA at 0.1 V. B) UA at 0.32 V, $E_i = 0.0$ V. C-D) Calibration curves obtained for: C) AA. D) UA.....	223
<u>Figure 5.9.</u> i-t curves obtained for successive additions of: A) AA (30 μ M), UA (420 μ M), glucose (5 mM), DP (1 μ M), EP (0.5 μ M) and AA (60 μ M) at $E_f = 0.1$ V. B) UA (120 μ M), AA (30 μ M), glucose (5 mM), DP (1 μ M), EP (0.5 μ M) and repeated two times at $E_f = 0.32$ V. $E_i = 0.0$ V.....	225
<u>Figure 5.10.</u> A) Calibration curve for UA in the presence of AA 4 μ M. Vertical configuration. B) Calibration curve for UA in the presence of AA 8 μ M. Horizontal configuration.....	227
<u>Figure 5.11.</u> Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real urine samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed by using drop-cell (horizontal configuration) in: PBS (dash-dotted line), diluted urine (1:2) (dashed line), diluted urine with 0.2 mM AA added (solid line). $v_{scan} = 0.1$ V s^{-1} . B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted urine (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0$ V. C-D) UA quantification by: C) CV performed by using beaker-cell (vertical configuration) in: PBS (dash-dotted line), diluted urine (1:50) (dashed line), diluted urine with 0.2 mM UA added (solid line). $v_{scan} = 0.1$ V s^{-1} , D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted urine (1:50) and 0.1 mM UA (2 times).....	231
<u>Figure 5.12.</u> Inter-sensor reproducibility studied on urine sample (dilution 1:100) with four electrodes.....	235
<u>Figure 5.13.</u> Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real perspiration samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS ((dash-dotted line)), diluted perspiration (1:1.3) (dashed line), diluted perspiration with 0.2 mM of AA added (solid line). $v_{scan} = 0.1$ V s^{-1} . B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted perspiration (1:1.3) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0$ V. Inset: Magnification of the j-t curve. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted perspiration (1:2) (dashed line), diluted perspiration with 0.2 mM of UA added (solid line). Inset: Magnification of the voltammogram. $v_{scan} = 0.1$ V s^{-1} . D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted perspiration (1:2) and 0.1 mM UA (2 times). $E_i = 0.0$ V.....	236
<u>Figure 5.14.</u> Comparison of the concentrations found in perspiration and urine samples of: A) AA. B) UA.....	240

Figure 5.15. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real serum samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted serum (1:2) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of AA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted serum (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted serum (1:2) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of UA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted serum (1:2) and 0.1 mM UA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$ 242

Figure 5.16. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real blood samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted blood (1:4) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of AA added (solid line). Inset: magnification of the voltammogram. $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted blood (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). Inset: j-t curve magnification. $E_i = 0.0 \text{ V}$. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted blood (1:4) (dashed line), diluted blood with 0.5 mM of UA added (solid line). Inset: magnification of the voltammogram. $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted blood (1:10) and 0.1 mM UA (2 times). Inset: j-t curve magnification. $E_i = 0.0 \text{ V}$ 246

CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

Figure 6.1. A) Diagram illustrating the design of the stretchable sensor, the enzymatic immobilization on the printed catalytic layer, and the reaction during detection. The Inset shows a real image of a screen-printed sensor. B) Preparation of the screen-printable, stretchable and catalytic ink. C) Screen-printing process showing layers of the components..... 266

Figure 6.2. A) Cyclic voltammograms for Pt-graphite line electrode in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in 80 mM glucose (solid line). Inset: magnified zone. B) Calibration curves obtained from chronoamperometry representing the linear range at -0.4 V (solid line) and at 0.2 V (dashed line)..... 268

Figure 6.3. A-B) Electrochemical behavior of GOx/Pt-graphite line electrode: A) cyclic voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in PBS containing 25 mM glucose (solid line). $v_{scan} = 0.05 \text{ V s}^{-1}$. B) Calibration curve

obtained representing the linear range. Inset: j-t curves at -0.2 V obtained on increasing glucose concentrations: 0 mM (a), 0.01 mM (b), 0.05 mM (c), 0.1 mM (d), 0.25 mM (e), 0.5 mM (f), 0.75 mM (g), 1 mM (h), 2 mM (i), 3 mM (j), 4 mM (k) and 5 mM (l). $E_i = 0$ V. $E_f = -0.2$ V..... 270

Figure 6.4. A-B) Electrochemical behavior of the stretchable GOx/Pt-graphite biosensor: A) cyclic voltammograms in PBS (0.25M, pH 7.0) (dashed line) and in 0.9 mM glucose solution (solid line). $v_{scan} = 0.05$ V s⁻¹. B) Calibration curve representing the linear range. Inset: j-t curves at -0.35 V obtained on increasing glucose concentrations from 0 mM (a) 0.01 mM (b), 0.03 mM (c), 0.05 mM (d), 0.1 mM (e), 0.2 mM (f), 0.3 mM (g), 0.4 mM (h), 0.5 mM (i), 0.6 mM (j), 0.7 mM (k), 0.8 mM (l) and to 0.9 mM (m), $E_i = 0.0$ V, $E_f = -0.35$ V. C) Evaluation of enzyme immobilization by Michaelis constant. D) j-t curve showing the effect at spiking levels of 10 μ M AA, 5 μ M UA, 1 μ M DP and 0.5 μ M EP on a solution containing 100 μ M glucose at -0.35 V. $E_i = 0.0$ V.....272

Figure 6.5. Comparison of Contour XT[®] glucose meter ($C_{GLU\ BLOOD}$) and our biosensor ($C_{GLU\ PERSPIRATION}$) using regression analysis for perspiration and blood samples..... 277

ANNEX TO CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

Figure A-6.1. Cyclic voltammograms for a Pt electrode (solid line) and a Pt-graphite/GC electrode (dashed line) in PBS (0.25 M, pH 7.0)..... 285

Figure A-6.2. (A-B) TEM images for Pt-graphite powder at different magnifications. (C-F) FESEM images for: C) graphite powder. D-E) Pt-graphite powder (secondary electrons and backscattered electrons, respectively). F) EDX-mapping (Pt-graphite powder). G) XPS spectra for Pt-graphite powder..... 287

Figure A-6.3. Electrochemical behavior towards H₂O₂: A-B) cyclic voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in 5mM H₂O₂ (solid line) for: A) graphite line electrode. B) Pt-graphite line electrode. C) i-t curves obtained with Pt-graphite line electrode to increasing H₂O₂ concentrations from 0 mM (a) to 25 mM (i) with 2 mM (0-10 mM) and 5 mM (10-25 mM) increments; $E_i = 0$ V, $E_f = -0.20$ V. D) Calibration curves obtained for graphite line (dashed line) and Pt-graphite line (solid line) electrodes.....289

Figure A-6.4. A-B) Pt-graphite sensor: A) images illustrating strain studies applied on stretchable Pt-graphite sensor. B) cyclic voltammograms in 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (0.25 M PBS, pH 7) after strain was applied 50 times at 0%, 25%, 50% and 75%. C-D) GOx/Pt-graphite biosensor: C) images illustrating strain studies applied on GOx/Pt-graphite biosensor. D) chronoamperometry at -0.35 V for a 0.9 mM glucose solution after strain was applied 50 times at 0%, 25%, 50% and 75%.....291

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales

Figura 7.1. Voltametría cíclica en una disolución que contiene AA y UA mediante: A) electrodo Au-IDA sin modificar. B) Electrodo Gr-FMN/Au-IDA.....299



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Índice de tablas

CAPÍTULO 1

Introducción General

<u>Tabla 1.1.</u> Niveles normales de AA en fluidos fisiológicos.....	51
<u>Tabla 1.2.</u> Niveles normales de UA en fluidos fisiológicos.....	55
<u>Tabla 1.3.</u> Niveles normales de glucosa en fluidos fisiológicos.....	61

CAPÍTULO 2

Técnicas y métodos experimentales

<u>Tabla 2.1.</u> Tipos de técnicas espectroscópicas para el análisis de superficies.....	109
---	-----

CHAPTER 3

FMN-graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid

<u>Table 3.1.</u> Analytical parameters obtained for UA quantification with both modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA).....	153
<u>Table 3.2.</u> Analytical parameters obtained for UA quantification in the presence of AA (250 μ M) with the two modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA).....	158
<u>Table 3.3.</u> Comparison of analytical parameters for several electrochemical UA sensors by voltammetric detection.....	162

CHAPTER 4

Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped GO for the simultaneous determination of AA and UA in urine samples

<u>Table 4.1.</u> Analytical figures of merit for the quantification of AA and UA by the Au-GO/Au-IDA modified electrode.....	185
<u>Table 4.2.</u> Comparison of analytical characteristics for several electrochemical AA and UA sensors.....	190

CHAPTER 5

Successful determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids by an electrochemical and portable sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes

<u>Table 5.1.</u> Figures of merit for the AA and UA voltammetric determination by the hCNTs/Au-IDA modified electrode.....	215
<u>Table 5.2.</u> Figures of merit for the AA and UA voltammetric determination by the hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrode.....	216
<u>Table 5.3.</u> Figures of merit for the chronoamperometric quantification of AA and UA by the hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrode.....	224
<u>Table 5.4.</u> Figures of merit for the determination of UA in a solution of UA and in a mixture of UA and AA.....	228
<u>Table 5.5.</u> Comparison of analytical characteristics for several electrochemical AA and UA sensors.....	229
<u>Table 5.6.</u> Determination of AA and UA in real urine samples.....	233
<u>Table 5.7.</u> Determination of AA and UA in real perspiration samples.....	238
<u>Table 5.8.</u> Determination of AA and UA in real serum samples.....	244
<u>Table 5.9.</u> Evaluation of the trueness for the AA and UA quantification in blood samples for several dilutions.....	247

CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

<u>Table 6.1.</u> Analytical figures of merit for glucose quantification with Pt-graphite line electrode at -0.4 V and 0.2 V and GOx/Pt-graphite biosensor at -0.35 V.....	269
<u>Table 6.2.</u> Determination of glucose in real perspiration samples.....	276

ANNEX TO CHAPTER 6

A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration

<u>Table A-6.1.</u> Comparison of analytical characteristics for several electrochemical glucose sensors.....	292
---	-----

CHAPTER 7

Conclusiones generales

Tabla 7.1. Comparación de los sensores para AA y UA desarrollados en la presente Tesis Doctoral.....	298
--	-----



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y TÉRMINOS

4-ABA	Ácido 4-aminobenzoico
AA	Ácido ascórbico
AES	Espectroscopia de electrones Auger
Ag-NPs	Nanopartículas de plata
Au	Oro
Au-GO	Óxido de grafeno decorado con nanopartículas de oro
Au-GO/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de óxido de grafeno decorado con nanopartículas de oro
Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro
Au-NPs	Nanopartículas de oro
BE	Energía de ligadura
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Cronoamperometría
CE	Electrodo auxiliar o contraelectrodo
CNTs	Nanotubos de carbono
CPE	Electrodo de pasta de carbón
CV	Voltametría cíclica
CVD	Depósito químico en fase vapor
DHA	Ácido dehidroascórbico
DMF	Dimetilformamida

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Dopamina
DPV	Voltametría de pulso diferencial
E.C.	Método de calibración externa
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EDX	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
EM	Microsonda de electrones
EP	Epinefrina
FAD	Flavín adenín dinucleótido o dinucleotido flavina adenina
FESEM	Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo
FMN	Sal sódica de la riboflavina-5-fosfato
GC	Carbón vítreo
GO	Óxido de grafeno
GO/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de óxido de grafeno
GOx	Glucosa oxidasa
Gr	Grafeno
Gr-FMN	Grafeno estabilizado con riboflavina
Gr-FMN/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de grafeno estabilizado con riboflavina
hCNTs	Nanotubos de carbono herringbone

hCNTs/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de nanotubos de carbono herringbone
h-CNTs-4ABA	Nanotubos de carbono herringbone funcionalizados con ácido 4-aminobenzoico
hCNTs-4ABA/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de nanotubos de carbono herringbone funcionalizados con ácido 4-aminobenzoico
HER	Reacción de desprendimiento de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPOG	Grafito pirolítico altamente orientado
IHOAM	Mediador ad-átomo de hidroxilo
ITO	Óxido de indio y estaño
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KE	Energía cinética
MS	Espectrómetro de masas
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NHE	Electrodo normal de hidrógeno
OER	Reacción de desprendimiento de oxígeno
ORR	Reacción de reducción de oxígeno
PANI	Polianilina
PBS	Disolución tampón fosfato
PET	Polietileno tereftalato
PSS	Poliestirensulfato

Pt	Platino
PTFE	Politetrafluoroetileno
Pt-graphite	Grafito decorado con Pt-NPs
Pt-graphite/GC	Electrodo de carbón vítreo modificado con grafito decorado con nanopartículas de platino
Pt-Gr-FMN	Grafeno estabilizado con riboflavina decorado con nanopartículas de platino
Pt-Gr-FMN/Au-IDA	Red de microelectrodos interdigitados de oro modificados con una dispersión de grafeno estabilizado con riboflavina y decorado con nanopartículas de platino
Pt-NPs	Nanopartículas de platino
PU	Poliuretano
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Electrodo de referencia
rGO	Óxido de grafeno reducido
RHE	Electrodo reversible de hidrógeno
S.A.	Método de adición de estándar
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SERS	Espectroscopia Raman mejorada en superficie
SIMS	Espectrometría de masas de ion secundario
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared sencilla
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TPD	Desorción a temperatura programada
UA	Ácido úrico

UHV	Ultra alto vacío
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
WE	Electrodo de trabajo
WHO	Organización Mundial de la Salud
XPS	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

GLOSARIO DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

\bar{x}	Valor medio de una medida repetida, usualmente referido a la concentración de un analito
\bar{y}	Valor medio de una medida repetida, usualmente referido a la señal medida por una concentración analito
x_i	Cada una de las medidas de x realizadas
y_i	Cada una de las medidas de y realizadas
n	Número de replicados
s	Desviación estándar
t	Valor de la t de Student
a	Ordenada en el origen de la recta de regresión no ponderada
b	Pendiente de la recta de regresión no ponderada
r	Coefficiente de correlación
N	Número de patrones empleados para la construcción de la recta de regresión
s_a	Error asociado a la ordenada en el origen
s_b	Error asociado a la pendiente
$s_{y/x}$	Estadístico para estimar los errores aleatorios en la dirección y para una recta de regresión no ponderada
\hat{y}_i	Valor de y_i calculado a partir de la recta de calibrado
a_w	Ordenada en el origen de la recta de regresión ponderada
b_w	Pendiente de la recta de regresión ponderada

\bar{x}_w, \bar{y}_w	Coordenadas del centro de gravedad ponderado
w_i	Factor de ponderación
$S_{(y/x)_w}$	Estadístico para estimar los errores aleatorios en la dirección y para una recta de regresión ponderada
S_{x_0}	Error asociado a una concentración calculada mediante la recta de regresión no ponderada
$S_{x_0_w}$	Error asociado a una concentración calculada mediante la recta de regresión ponderada
y_0	Valor experimental de y proporcionado por la muestra a partir de cual se calcula la concentración de analito en la muestra
x_0	Concentración de analito en la muestra
w_0	Valor de ponderación para y_0 .
m	Número de lecturas para determinar y_0 .
S_{x_E}	Error asociado a una concentración calculada mediante el método de adición de estándar.
LOD	Límite de detección.
LOQ	Límite de cuantificación.
y_B	Señal proporcionada por el blanco.
S_B	Desviación estándar del blanco.
R	Factor de recuperación.
\bar{x}'	Valor medido de la concentración de analito tras la adición de una cantidad de analito perfectamente conocida.
x_{ref}	Concentración de analito en una muestra certificada.
RSD	Desviación estándar relativa.

Resumen

Los sensores y biosensores electroquímicos presentan un gran interés desde un punto de vista clínico, debido a que la concentración de muchos de los compuestos presentes en los fluidos fisiológicos humanos está relacionada con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades. Estos dispositivos presentan excelentes propiedades que han propiciado el uso de los mismos en la monitorización y cuantificación de analitos de importancia en fluidos fisiológicos. Por ello, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el desarrollo y funcionalización de diversos materiales carbonosos nanoestructurados para su posterior aplicación como elemento transductor en sensores y biosensores electroquímicos. En este trabajo se ha evaluado el efecto de emplear diferentes materiales carbonosos como elementos transductores en sensores voltamétricos y cronoamperométricos para la cuantificación de ácido ascórbico y ácido úrico en fluidos fisiológicos humanos (e.g., orina, sudor, suero y sangre). Se han empleado materiales carbonosos basados en grafito, grafeno, óxido de grafeno y nanotubos de carbono con estructura de espina de pescado (*herringbone*), siendo los tres primeros funcionalizados con nanopartículas metálicas (platino y oro), mientras que los nanotubos de carbono *herringbone* han sido sometidos a una funcionalización electroquímica covalente con ácido 4-aminobenzoico. Dispersiones acuosas de los materiales carbonosos han sido empleadas para modificar, mediante la técnica drop-casting, unas redes de microelectrodos interdigitados de oro. Los electrodos preparados basados en grafeno y en nanotubos de carbono han sido empleados en el desarrollo de sensores

voltamétricos para la detección de ácido ascórbico y ácido úrico, mostrando resultados prometedores.

Por otra parte, los electrodos basados en óxido de grafeno y nanotubos de carbono *herringbone*, estando ambos materiales funcionalizados, han sido evaluados para cuantificar simultáneamente ácido ascórbico y ácido úrico mediante cronoamperometría. El electrodo basado en nanotubos de carbono proporciona mejores sensibilidades, lo que es indicativo de las excepcionales propiedades que presentan estos materiales. Ambos sensores han sido empleados para el análisis de muestras reales, resaltando nuevamente las extraordinarias propiedades que presenta el sensor basado en nanotubos de carbono, ya que permite el análisis de matrices complejas como sangre, suero u orina, mediante la simple dilución de la muestra y haciendo uso de una calibración externa.

Finalmente, se ha desarrollado un biosensor basado en grafito decorado con nanopartículas de platino y sobre el cual se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa para la cuantificación de glucosa en muestras de sudor humano. Este biosensor ha sido preparado mediante la impresión manual de tintas flexibles sobre un sustrato que también presenta una elevada flexibilidad, de modo que puede ser fijado en la piel humana. La sensibilidad y límite de detección alcanzados con el dispositivo desarrollado ha permitido la cuantificación de glucosa en muestras reales de sudor humano. Además, se han correlacionado estas concentraciones con las existentes en sangre, resultando una alternativa competente a los glucómetros comerciales actuales.

Summary

Electrochemical sensors and biosensors are of great clinical interest due to the concentration of many of the compounds present in human physiological fluids have been related to several diseases. These devices have shown excellent properties that makes them adequate for the monitoring and quantification of analytes in physiological fluids. Therefore, this PhD thesis is based on the development and functionalization of carbon materials for their application as a transducer element of electrochemical sensors and biosensors. The effect of different nanostructured carbon materials has been evaluated as transducers for voltammetric and chronoamperometric sensors able to determine the ascorbic acid and uric acid concentrations in human physiological fluids (e.g., urine, perspiration, serum and blood). Carbon materials based on graphite, graphene, graphene oxide and herringbone carbon nanotubes have been employed, being the first three functionalized with metallic nanoparticles (platinum and gold), whereas carbon nanotubes have been subjected to an electrochemical functionalization with 4-aminobenzoic acid. Aqueous dispersions of carbon materials have been prepared to modify, by drop-casting, arrays of gold interdigitated microelectrodes, obtaining different electrodes. Graphene-based electrodes and carbon nanotubes-based electrodes have been used in the development of voltammetric sensors for the detection of ascorbic acid and uric acid, showing promising results.

On the other hand, the electrodes based on functionalized graphene oxide and herringbone carbon nanotubes have been evaluated for the simultaneous quantification of ascorbic acid and uric acid by

chronoamperometry. The electrode based on herringbone carbon nanotubes provides better sensitivities, which is linked to its exceptional properties. Both sensors have been evaluated towards the analysis of real samples, highlighting once again the extraordinary properties that the sensor based on carbon nanotubes present. It allows the analysis of complex matrices like blood, serum or urine, by simple dilution of the sample and by using an external calibration.

Finally, a graphite-based biosensor decorated with platinum nanoparticles and glucose oxidase immobilized has been developed for the quantification of glucose in human sweat samples. This biosensor has been prepared by the manual printing of stretchable inks on a substrate which also has high flexibility, and it is able to be fixed on human skin. The sensitivity and limit of detection achieved with the developed device have allowed the quantification of glucose in real samples such as human perspiration. In addition, these concentrations have been correlated with those in blood, thus, being a suitable alternative to current commercial glucose meters.



Objetivos y estructura
general de la Tesis Doctoral

1. Introducción

La presente Tesis Doctoral se basa en el desarrollo de electrodos nanoestructurados basados en materiales carbonosos, funcionalizados mediante síntesis química y electroquímica, y su aplicación como sensores y biosensores electroquímicos para la cuantificación de diferentes analitos (ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa). A lo largo de la memoria se presentan los métodos experimentales que se han empleado para la síntesis de estos materiales, la caracterización de los mismos y finalmente, la evaluación y el estudio de las aplicaciones como sensores electroquímicos y los resultados obtenidos.

2. Objetivos de la Tesis Doctoral

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la preparación y modificación de materiales carbonosos nanoestructurados para su evaluación como materiales electródicos en el desarrollo de sensores electroquímicos, que además puedan ser portátiles. Los materiales electródicos desarrollados se emplearán para modificar una red de microelectrodos interdigitados de oro, lo que permite el análisis de pequeños volúmenes de muestra. Además, también se lleva a cabo el desarrollo de un biosensor flexible que puede ser fijado a la piel para la detección de glucosa. El objetivo general planteado da lugar a los siguientes objetivos específicos:

- Síntesis y funcionalización de materiales carbonosos nanoestructurados como grafeno estabilizado con riboflavina y óxido de grafeno, así como de

otros materiales comerciales como nanotubos de carbono con estructura de espina de pescado (*herringbone*) y grafito, mediante el uso de métodos de síntesis química y electroquímica. La funcionalización se realizará mediante la introducción de nanopartículas metálicas (platino y oro) y de grupos funcionales con diversos heteroátomos (oxígeno y nitrógeno).

- Caracterización química y electroquímica de los materiales desarrollados, así como la evaluación de su actividad electrocatalítica en las reacciones de oxidación de ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa.

- Desarrollo de sensores electroquímicos portátiles a partir de los materiales electródicos preparados para la cuantificación de ácido ascórbico y ácido úrico en muestras fisiológicas humanas (sudor, orina, suero y sangre).

- Desarrollo de biosensores electroquímicos de primera generación, flexibles y portátiles, mediante la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa para la cuantificación in-situ de glucosa en muestras de sudor humano.

3. Estructura de la Tesis Doctoral

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en los grupos de investigación de Electrocatálisis y Electroquímica de Polímeros (GEPE) y de Espectroscopía Atómica-Masas y Química Analítica en condiciones extremas, ambos pertenecientes al Instituto de Materiales de la Universidad de Alicante. Además, parte de la investigación ha sido desarrollada en el Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba bajo la supervisión del catedrático Rafael Rodríguez Amaro y en el Departamento de Nanoingeniería (Nanoengineering Department) de la

Universidad de San Diego, California (UCSD) y bajo la supervisión del doctor Joseph Wang.

Debido a que la presente Tesis Doctoral opta a la Mención Internacional, los capítulos de la misma correspondientes a los resultados obtenidos han sido redactados en inglés, con el propósito de cumplir con la normativa.

Esta Tesis Doctoral se encuentra estructurada en siete capítulos, además de un resumen de la misma, escrito en inglés y en castellano, al comienzo de la memoria. A continuación, se presenta un resumen general del contenido de los capítulos incluidos en la presente memoria.

- Capítulo 1. Introducción general.

Este capítulo presenta los conocimientos básicos adquiridos que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Para ello, se comienza mediante una presentación general de los sensores y biosensores electroquímicos, así como los beneficios que presenta dotar de portabilidad a estos dispositivos. A continuación, se presentan las ventajas de emplear materiales carbonosos nanoestructurados para el desarrollo de sensores electroquímicos, por lo que previamente se presenta un resumen de las características de estos materiales, especialmente de aquellos que han sido empleados (grafito, grafeno, óxido de grafeno y nanotubos de carbono). El capítulo concluye mediante la evaluación de la importancia, desde un punto de vista clínico, de la cuantificación de los analitos de interés en este trabajo (ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa), así como una revisión de los dispositivos desarrollados y empleados hasta la actualidad para la determinación de estos compuestos en fluidos humanos.

- **Capítulo 2.** Técnicas y métodos experimentales.

En este capítulo se presentan los materiales carbonosos nanoestructurados empleados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, así como el modo de preparación de los dispositivos desarrollados y el tipo de muestras fisiológicas que han sido analizadas. Este capítulo también contiene un breve resumen del fundamento en el cual están basadas las técnicas experimentales que han sido empleadas, tanto para caracterizar los materiales preparados como para llevar a cabo el posterior desarrollo de los sensores electroquímicos. Puesto que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de sensores para la cuantificación de diversos analitos, se ha incluido un apartado dedicado a la validación de un nuevo método normalmente empleada para la evaluación del mismo y de sus resultados. Finalmente, se presentan los métodos de síntesis y funcionalización mediante los cuales se han preparado los materiales que permitirán la posterior fabricación de los sensores electroquímicos.

- **Chapter 3.** Flavin mononucleotide-exfoliated graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid.

Este capítulo presenta el desarrollo de dos sensores electroquímicos cuyo material electródico consiste en grafeno estabilizado con riboflavina y éste mismo material modificado con nanopartículas de Pt, siendo ambos materiales preparados a partir de grafito comercial. La síntesis empleada permite la obtención de dispersiones acuosas estables de grafeno de elevada concentración, lo que permite, por una parte, mejorar

notablemente el tiempo de preparación de los electrodos y por otra, evitar el uso de disolventes orgánicos. Estas dispersiones se emplean para modificar una red de microelectrodos interdigitados de oro, que actúa de soporte del material electródico desarrollado. Los electrodos preparados a partir de las dos dispersiones se evaluaron mediante voltametría cíclica frente a la oxidación de ácido úrico, con el objetivo de desarrollar un método electroquímico para la cuantificación del mismo, obteniéndose los resultados más favorables con el electrodo que contiene platino. Finalmente, mediante el uso de una estrategia estadística se comprueba que el sensor es capaz de cuantificar ácido úrico, incluso cuando cantidades de ácido ascórbico muy superiores a las encontradas en los fluidos fisiológicos están presentes en la muestra de análisis.

Los resultados de este capítulo han dado lugar a las siguientes contribuciones científicas:

Publicaciones:

1. A. Abellán-Llobregat, M. Ayán-Varela, L. Vidal, J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Canals, E. Morallón. Flavin mononucleotide-exfoliated graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. *J. Electroanal. Chem.* 783 (2016) 41-48. doi: 10.1016/j.jelechem.2016.10.055.

Comunicaciones orales:

2. A. Abellán-Llobregat, M. Ayán-Varela, L. Vidal, J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Canals, E. Morallón. Microelectrodos modificados con

grafeno funcionalizado para la determinación de ácido úrico en presencia de ácido ascórbico. XIII Reunión del Grupo Español del Carbón. Alicante, 18-21 de Octubre de 2015.

3. A. Abellán-Llobregat, L. Vidal, A. Canals, E. Morallón, M. Ayán-Varela, S. Villar-Rodil. Detección de ácido úrico en presencia de ácido ascórbico como interferente sobre grafeno modificado. XVI Escuela Nacional de Materiales Moleculares. Santa Pola, 1-6 de Febrero de 2015.
4. A. Abellán-Llobregat, M. Ayán-Varela, L. Vidal, J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Canals, E. Morallón. Modified electrodes with metal nanoparticles supported on graphene for the uric acid detection. XI Jornadas Científicas del Instituto Universitario de Materiales. Alicante, 22-23 de Enero de 2015.

- **Chapter 4.** Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples.

Este capítulo presenta la preparación de un sensor electroquímico basado en la modificación de una red de microelectrodos interdigitados de oro con óxido de grafeno funcionalizado con nanopartículas de oro, para la cuantificación de ácido ascórbico y ácido úrico en muestras de orina. La cuantificación de estos analitos se realiza mediante cronoamperometría a los potenciales a los que se oxidan estos analitos, obteniéndose parámetros analíticos satisfactorios, que permiten que el método pueda ser aplicado en un gran número de fluidos fisiológicos humanos. Se han estudiado las

posibles interferencias de otros compuestos como dopamina, epinefrina y glucosa, obteniéndose que no interfieren en la cuantificación de ácido ascórbico y ácido úrico. Finalmente, se han analizado muestras de orina humana, donde se ha empleado el método de adición de estándar con el propósito de corregir los efectos de matriz existentes debido a la complejidad de este tipo de muestras.

Los resultados obtenidos en este capítulo han permitido las siguientes contribuciones científicas:

Publicaciones:

1. A. Abellán-Llobregat, L. Vidal, R. Rodríguez-Amaro, Á. Berenguer-Murcia, A. Canals, E. Morallón. Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples. *Electrochimica Acta*, 227 (2017) 275-284. doi: 10.1016/j.electacta.2016.12.132.

Comunicaciones orales:

2. A. Abellán-Llobregat, L. Vidal, R. Rodríguez-Amaro, Á. Berenguer-Murcia, A. Canals, E. Morallón. Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid with graphene modified electrodes. XXXVI Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química /XVII Encontro Ibérico de Electroquímica. Vigo, 13-15 de Julio de 2015.

Comunicaciones (póster):

3. A. Abellán-Llobregat, L. Vidal, R. Rodríguez-Amaro, Á. Berenguer-Murcia, A. Canals, E. Morallón. Determinación de ácido úrico y ácido ascórbico mediante redes de microelectrodos modificadas con óxido de grafeno y nanopartículas de oro. XXXVII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Alicante, 17-20 de Julio 2016.

- **Chapter 5.** Successful determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids by an electrochemical and portable sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes.

En este capítulo se presenta el desarrollo de dos sensores electroquímicos portátiles, basados en la modificación de redes de microelectrodos interdigitados de oro mediante nanotubos de carbono *herringbone* y mediante esos nanotubos funcionalizados con ácido 4-aminobenzoico. La actividad electrocatalítica de ambos electrodos frente a la oxidación individual y simultánea de ácido ascórbico y ácido úrico ha sido evaluada mediante voltametría cíclica y cronoamperometría, siendo el electrodo modificado con el material funcionalizado el que mejores resultados presenta. El método cronoamperométrico ha proporcionado excelentes resultados en el análisis de ácido ascórbico y ácido úrico en una gran variedad de muestras fisiológicas (sudor, orina, suero y sangre). La gran mejora que presentan estos sensores desarrollados frente a los ya existentes, es la posibilidad de analizar una gran variedad de matrices (algunas de ellas realmente complejas) mediante una única calibración

externa, que permite llevar a cabo un gran número de análisis en un corto período de tiempo.

Los resultados obtenidos en este capítulo han permitido las siguientes contribuciones científicas:

Publicaciones:

1. A. Abellán-Llobregat, C. Gonzalez-Gaitan, L. Vidal, A. Canals, E. Morallón. Successful determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids by an electrochemical and portable sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes (en redacción).

Comunicaciones (póster):

2. A. Abellán-Llobregat, C. Gonzalez-Gaitan, L. Vidal, A. Canals, E. Morallón. Quantification of ascorbic acid and uric acid using arrays of microelectrodes modified with carbon nanofibers functionalized with 4-ABA. 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE). August 2016 in The Hague, The Netherlands.

- Chapter 6. A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for the determination of glucose in human perspiration.

Este capítulo presenta el desarrollo de un biosensor electroquímico, flexible y portátil para la cuantificación de glucosa in-situ en muestras de sudor humano. Este biosensor se ha preparado mediante la impresión manual de tintas electroactivas dotadas de cierta flexibilidad por la adición de

polímeros, sobre un soporte que también es flexible. El material electródico empleado es grafito, sobre el cual se han sintetizado nanopartículas de platino, y sobre el que posteriormente se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa. La determinación de glucosa se lleva a cabo mediante cronoamperometría, cuantificando el peróxido de hidrógeno generado a través de la reacción entre la glucosa oxidasa reducida (tras oxidar la glucosa a ácido glucónico) y el oxígeno molecular presente en el medio. El biosensor, cuyos parámetros analíticos superan a los encontrados en la bibliografía, ha sido utilizado con éxito para el análisis de muestras de sudor humano, demostrándose además que existe una correlación entre los niveles de glucosa encontrados en sudor y en sangre. Por ello, el biosensor desarrollado representa una alternativa competitiva a los glucómetros actualmente existentes.

Los resultados de este capítulo han dado lugar a las siguientes contribuciones científicas:

Publicaciones:

1. A. Abellán-Llobregat, I. Jeerapan, A. Bandodkar, L. Vidal, A. Canals, J. Wang, E. Morallón. A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration. *Biosensors and Bioelectronics* (en prensa, doi: 10.1016/j.bios.2017.01.058).

Contribuciones orales:

2. A. Abellán-Llobregat, I. Jeerapan, A. Bandodkar, L. Vidal, A. Canals, J. Wang, E. Morallón. Sensor electroquímico flexible para la detección de glucosa. XXXVII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química. Alicante, 17-20 de Julio 2016.

Además, fue premiado como mejor póster en un congreso internacional:

3. A. Abellán-Llobregat, I. Jeerapan, A. Bandodkar, L. Vidal, A. Canals, J. Wang, E. Morallón. Stretchable electrochemical device for the enzymatic determination of glucose. Best Poster Prize presented in Symposium 01 at the 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE). August 2016 in The Hague, The Netherlands.

- Capítulo 7. Conclusiones generales.

En este capítulo se presentan las conclusiones que han sido extraídas del trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral.



CAPÍTULO 1

Introducción general

1. Sensores y biosensores electroquímicos

1.1. Interés en el desarrollo de sensores y biosensores

La cuantificación de procesos biológicos y bioquímicos, o de determinados compuestos presentes en fluidos fisiológicos presenta un gran interés en el área de la medicina, biología y biotecnología. Sin embargo, la transformación de información biológica en una señal eléctrica fácilmente procesable supuso un gran reto, debido a la complejidad que supone conectar directamente un dispositivo electrónico a un medio biológico. Con el propósito de alcanzar este objetivo, en las últimas décadas se han desarrollado diversos dispositivos basados en el concepto de detección, entre ellos los sensores y biosensores [1]. Desde la aparición de estos dispositivos, la electroquímica, en la cual están basados muchos de los procesos biológicos, ha tenido una gran importancia en el desarrollo de los mismos. La transducción electroquímica, que consiste en transformar una señal química en una señal eléctrica y que comprende técnicas como la voltametría cíclica (CV) o la amperometría, es actualmente una de las estrategias más usadas en el campo de los sensores y biosensores [2]. Los sensores y biosensores electroquímicos proporcionan un modo atractivo para llevar a cabo el análisis de muestras biológicas, debido a que son capaces de proporcionar una señal eléctrica a partir de un proceso químico. Además, el descubrimiento de la nanociencia y la nanotecnología, y su enorme éxito, han tenido una gran influencia en el desarrollo de sensores y biosensores impulsando la investigación de nuevos materiales y biomateriales empleados en la preparación de electrodos. Esto ha hecho

posible que estos dispositivos electroquímicos puedan ser empleados en diferentes áreas, gracias a las propiedades eléctricas, mecánicas y físicas mejoradas que presentan estos nuevos materiales, así como una superior biocompatibilidad. En particular, la incorporación de nanoestructuras a los electrodos ha proporcionado una mayor área superficial, que está directamente relacionada con la señal eléctrica medible. Además, la incorporación de nano-materiales como, quantum dots, nanotubos de carbono, y nanopartículas metálicas, entre otros, proporciona excepcionales propiedades, constituyendo una estrategia que se encuentra en auge en el desarrollo de los sensores y biosensores electroquímicos.

1.2. Definición y fundamentos

Un sensor químico se define como un dispositivo que transforma información química, que es generada a partir de una reacción química o de una propiedad física, en una señal analítica útil [3,4]. Están formados por dos componentes principales: un receptor y un transductor. Además, algunos sensores pueden incluir un componente para separar ambas unidades (membrana). El receptor es el responsable de transformar la información química en una forma de energía que pueda ser cuantificada, mientras que el transductor transforma esta energía medible en una señal analítica.

La clasificación de los sensores se basa, en primer lugar, en los diferentes tipos de receptores empleados [3]:

- Físicos: basados en la medida de una propiedad física, como la masa, conductividad y temperatura, entre otros.

- Químicos: la señal analítica es proporcionada mediante una reacción química en la que participa el analito.
- Bioquímicos: el proceso bioquímico es la fuente de la señal analítica. Estos son los llamados biosensores.

Además, los sensores químicos también pueden clasificarse en función del principio de operación del transductor, encontrándose, por tanto, la siguiente clasificación: sensores ópticos, sensores electroquímicos, sensores eléctricos, sensores sensibles a cambios de masa, sensores magnéticos y sensores termométricos.

Los sensores electroquímicos, cuyo esquema se muestra en la Figura 1.1, destacados por sus excepcionales características, como simplicidad, bajo coste, análisis rápido de muestras, y elevada selectividad y sensibilidad [5-7]; obtienen la señal analítica a partir de una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. Basados en este principio se distinguen los sensores voltamétricos, potenciométricos y amperométricos.

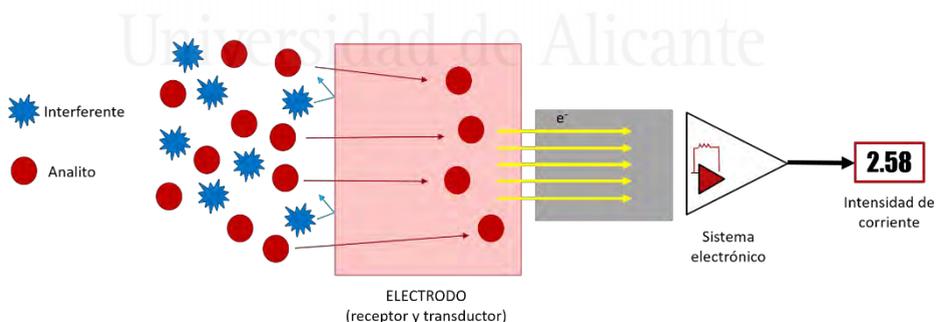


Figura 1.1. Esquema de un sensor electroquímico.

Por otra parte, la investigación relacionada con los biosensores, que se definen como dispositivos analíticos capaces de convertir una respuesta

biológica en una señal analítica, ha experimentado un gran crecimiento en las últimas décadas, debido principalmente a que combinan las ventajas analíticas del uso de técnicas electroquímicas junto con la especificidad de los procesos de reconocimiento biológico [7,8]. La Figura 1.2 muestra el esquema y los componentes principales de un biosensor. Como puede observarse, estos dispositivos están compuestos por un bioreceptor que se une de manera específica al analito donde tiene lugar la reacción biológica. Esto genera una señal que es recogida por un transductor, que consiste en un electrodo en el caso de un biosensor electroquímico.

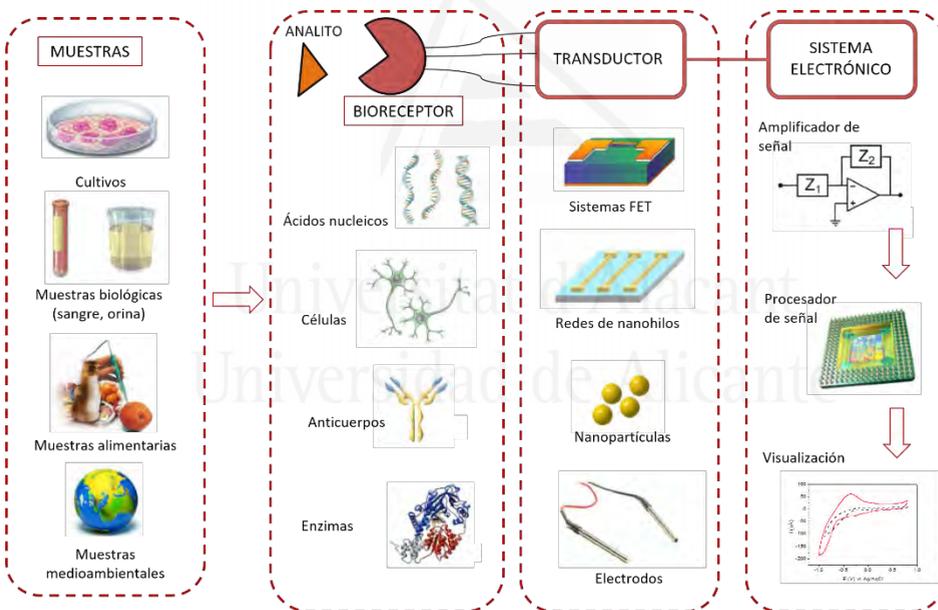


Figura 1.2. Esquema y componentes de un biosensor (Fuente: Ref. [1]).

Los biosensores presentan una mayor selectividad que los sensores químicos, debido básicamente a la posibilidad de modular la interacción específica de los compuestos mediante la inmovilización de elementos

biológicos de reconocimiento en la superficie del sensor, los cuales tienen una elevada afinidad para enlazarse específicamente a la molécula de estudio [9]. Como se puede observar en la Figura 1.2 existen diversos tipos de bioreceptores, siendo las enzimas los elementos de reconocimiento más empleados [1]. Uno de los factores clave en la preparación de biosensores enzimáticos es la estabilidad de las enzimas, la cual depende tanto del tiempo de vida de la enzima como de la desactivación o inhibición de la misma por las condiciones a las que se somete durante la preparación y uso del dispositivo. Para minimizar la probabilidad de desactivación o inhibición de la enzima, se recurre a la inmovilización de la misma sobre la superficie del sensor, siendo ésta una de las estrategias más empleadas. Los principales modos de inmovilización que permiten conservar la actividad enzimática incluyen el encapsulamiento, la inmovilización covalente o la mutagénesis [10].

Los biosensores se clasifican en función del biocomponente inmovilizado y/o de acuerdo al método de transducción, siendo los biosensores electroquímicos los más empleados. Entre los más comunes cabe destacar los sensores electroquímicos de ácido desoxirribonucleico (DNA), biosensores amperométricos enzimáticos, biosensores conductimétricos, inmunosensores de impedancia y biosensores de electroquimioluminiscencia [2], siendo los biosensores amperométricos los más extendidos y comercializados. La importancia de estos biosensores es tal que el desarrollo de la biotecnología analítica surgió a partir de ellos [11]. En la sección 3.3.2 se presentan los biosensores electroquímicos de glucosa,

los cuales se catalogan en tres generaciones de acuerdo al modo en el que se lleva a cabo la detección del analito.

1.3. Materiales empleados como electrodos (transductores)

Actualmente, se emplean una gran variedad de materiales como transductores en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos. Como condición principal, estos materiales han de ser conductores. Se han empleado una gran variedad de materiales electródicos, tanto modificados como sin modificar, como oro (Au) [12], platino (Pt) [13], grafito [14], y óxido de indio y titanio (ITO) [15], entre otros. Actualmente, los materiales carbonosos son ampliamente empleados en el desarrollo de estos dispositivos. La sección 2.7 profundiza en el uso/descripción de sensores y biosensores basados en estos materiales.

Otros materiales, como los polímeros conductores, entre ellos polianilina (PANI), polipirrol y poliestireno, también se han empleado con este propósito [1].

Además, el desarrollo de sensores y biosensores basados en electrodos impresos (*screen-printed electrodes*) [16–20] o redes de electrodos interdigitados (IDA) [21–23] ha aumentado considerablemente, dada la simplicidad y el bajo coste de fabricación que suponen, así como la facilidad de ser preparados a gran escala [1]. Además, el uso de este tipo de electrodos supone ciertas ventajas, como dotar de portabilidad a estos dispositivos o la posibilidad de llevar a cabo análisis con pequeños volúmenes de muestra.

1.4. Aplicaciones

Los sensores y biosensores electroquímicos son dispositivos pequeños y generalmente portátiles, que pueden ser usados para medir la concentración de uno o varios analitos en la matriz de una muestra. Idealmente, estos dispositivos son capaces de proporcionar una respuesta continua y reversible sin que haya ninguna perturbación en la muestra. Estas características han hecho posible el desarrollo de un gran número de aplicaciones dentro del campo clínico, industrial, medioambiental y alimentario [7].

Dentro del campo de la medicina, los sensores y biosensores electroquímicos han sido empleados para el diagnóstico de múltiples enfermedades, así como también han facilitado la vida rutinaria de numerosos pacientes. Actualmente, más del 80% de los dispositivos comerciales para el diagnóstico clínico están basados en los biosensores amperométricos [11]. Los biosensores para la medición de glucosa en sangre, suero y otros fluidos fisiológicos han sido los más extensamente estudiados y comercializados [24], tanto en componentes de analizadores clínicos, como en tiras desechables de un solo uso, diseñadas para el autodiagnóstico de pacientes.

2. Materiales carbonosos

2.1. Enlaces C-C y formas alotrópicas del carbono

El tipo de hibridación existente entre los átomos de carbono da lugar a las diferentes formas alotrópicas del carbono. Existen tres tipos diferentes de

hibridación (sp^3 , sp^2 y sp), en función de la cual se obtiene una gran variedad de enlaces químicos. Esto da lugar a una gran familia de moléculas, que unidas entre sí dan lugar a los diferentes materiales carbonosos inorgánicos. Basándose en la extensión mediante la repetición de los tres tipos de enlace C-C hasta formar moléculas infinitas, se establecen las formas alotrópicas del carbono: diamante, grafito, fullereno y carbino [25].

El diamante se caracteriza por tener una hibridación sp^3 , formando un enlace covalente que se extiende en las tres direcciones, lo que le confiere una elevada dureza. Además, debido a la elevada localización de los electrones y a la no existencia de electrones π , tiene propiedades aislantes. La forma alotrópica con enlace sp^2 está representada por el grafito, que se caracteriza por capas planas de hexágonos de átomos de carbono unidos mediante orbitales sp^2 y apiladas en paralelo con una regularidad ABAB (estructura cristalina hexagonal) o ABCABC (estructura romboédrica), entre otras posibilidades.

Por otra parte, la naturaleza del enlace en los fullerenos también es sp^2 , aunque diferente al existente en grafito debido a que algunos enlaces se curvan para formar pentágonos de átomos de carbono.

Finalmente, los carbinos se caracterizan por presentar una hibridación sp que da lugar a un enlace lineal, donde dos electrones π se encuentran en resonancia, dando lugar a dos posibles estructuras: una de ellas formada a partir de la repetición alternada de enlaces simples y triples (poliino) y la segunda correspondiente a la repetición de dobles enlaces (cumuleno).

Debido a que en la presente Tesis Doctoral los materiales carbonosos empleados han sido: grafito, grafeno (Gr), óxido de grafeno (GO) y

nanotubos de carbono (CNTs), a continuación se presentan algunas propiedades de los mismos.

2.2. Grafito

El grafito es la forma del carbono más estable en condiciones normales [26] y dadas las propiedades que posee es el más empleado en aplicaciones electroquímicas [27]. Puede encontrarse de forma natural (definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como mineral encontrado en la naturaleza, independientemente de su cristalinidad [28]) o pueden prepararse mediante el calentamiento de carbones amorfos a temperaturas de unos 2500°C. Este proceso genera la orientación de las distintas capas para generar una estructura ordenada [27].

La estructura del grafito se caracteriza básicamente, por el apilamiento de capas de hexágonos de carbono. Los enlaces σ entre vecinos dentro de las láminas se forman a partir del solapamiento de orbitales híbridos sp^2 , y los orbitales p perpendiculares restantes se solapan para formar los enlaces π que están deslocalizados sobre el plano. El apilamiento regular de estas capas da lugar a dos estructuras cristalinas, la estructura cristalina hexagonal (ABAB) y la romboédrica (ABCABC), siendo la distancia entre átomos de carbono en una misma capa de 0.1412 nm y el espacio entre capas vecinas de 0.33545 nm, lo que indica que las fuerzas existentes entre las capas son más débiles.

Es un compuesto blando y de apariencia grisácea, y presenta unas propiedades que lo hacen útil para una gran variedad de aplicaciones. Entre sus propiedades, cabe destacar las relacionadas con metales, como elevada

conductividad eléctrica y térmica, así como las características de los no metales, como la escasa reactividad (salvo bajo ciertas condiciones), resistencia térmica a temperaturas superiores a 3000°C, lubricidad, compresibilidad y elasticidad [27]. La conductividad eléctrica y muchas de las propiedades químicas del grafito se encuentran estrechamente relacionadas con la estructura de sus enlaces π deslocalizados. El grafito es un semiconductor en la dirección perpendicular a los planos, siendo su conductividad eléctrica baja (5 S cm⁻¹ a 25°C), la cual aumenta con el incremento de temperatura. Sin embargo, el grafito se comporta como un metal, o semimetal, en la dirección paralela a los planos. Su conductividad eléctrica en esta dirección es mucho más alta (30 kS cm⁻¹ a 25°C), pero disminuye conforme aumenta la temperatura [29].

2.3. Grafeno

El grafeno ha sido uno de los materiales más estudiados desde que los físicos Geim y Noselov, en 2004, consiguieron aislar por primera vez una monocapa de grafeno a partir de una muestra de grafito [30]. El grafeno, definido de un modo estricto, consiste en una monocapa bidimensional de hexágonos de carbono con hibridación sp² y dispuestos en una red en panal de abeja [31] (Figura 1.3). Además, constituye la unidad básica de otras formas alotrópicas del carbono, como el grafito, los nanotubos de carbono o los fullerenos [32], por lo que ya había sido objeto de estudio antes de que fuese aislado.

La conjugación π existente en el grafeno es responsable de las excepcionales propiedades térmicas, mecánicas y electrónicas inherentes a este material.

Pese a que se han llevado a cabo numerosos intentos para llevar a cabo su síntesis, solo algunos han tenido éxito bajo condiciones determinadas. La mayoría de las síntesis han seguido las siguientes rutas: (1) exfoliación mecánica de grafito; (2) exfoliación de grafito a través de sus compuestos de intercalación (empleada en la presente Tesis Doctoral, Capítulo 3); (3) depósito en fase vapor (CVD) de un hidrocarburo; y, (4) síntesis vía química orgánica.

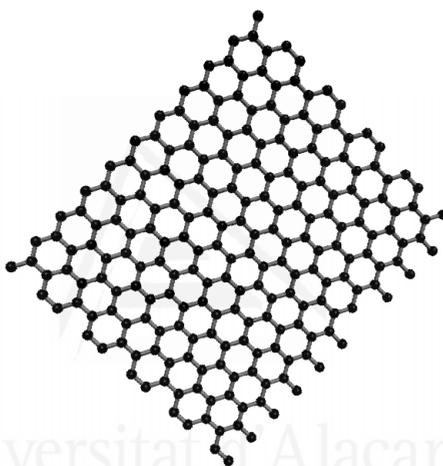


Figura 1.3. Esquema de la estructura cristalina del grafeno.

En algunas ocasiones, la palabra grafeno también puede ser empleada con un significado más amplio, llegando a englobar grafito de hasta 10 capas [33]. Sin embargo, en estos casos es importante indicar si se trata de grafeno monocapa, bicapa o multicapa debido a la fuerte dependencia de las propiedades del grafeno con el número de capas. Además, otro aspecto a tener en cuenta es que las monocapas de grafeno no son completamente planas, sino que presentan una tendencia a doblarse y arrugarse. Sin embargo, esta flexibilidad es menos pronunciada en las bicapas e inexistente en el grafeno multicapa [33]. Además de esta capacidad

intrínseca de arrugarse, el grafeno puede presentar otros “defectos”, incluyendo defectos topológicos (pentágonos, heptágonos o combinación de ambos), vacantes, ad-átomos, bordes y grietas, entre otros [34].

Las excelentes propiedades del grafeno también son una consecuencia directa de la hibridación sp^2 de los átomos de carbono. Por ejemplo, el grafeno debe su escasa reactividad o su elevada resistencia mecánica a sus fuertes enlaces en el plano, en los que los electrones están localizados entre los núcleos de los átomos enlazados. De forma análoga, sus propiedades opto-electrónicas son consecuencia de la deslocalización de los electrones de los orbitales $2p_z$. Las excepcionales propiedades que presenta este material carbonoso hace posible su aplicación en diversos campos.

El grafeno monocapa es un material casi transparente, donde además la reflectancia es despreciable ($< 0.1\%$) [35], lo que lo convierte en un buen candidato para la fabricación de electrodos transparentes para dispositivos electrónicos como pantallas [36,37], entre otras aplicaciones. Las propiedades mecánicas de grafeno pristino han podido ser determinadas mediante experimentos de nanoindentación en un microscopio de fuerza atómica, presentando valores del módulo de Young y de la resistencia a la tracción de 1.0 TPa y 130 GPa, respectivamente [38]. De acuerdo a estos resultados, el grafeno constituye el material con mayor resistencia mecánica a la tracción conocido. Por otra parte, la conductividad térmica del grafeno monocapa suspendido se sitúa en torno a $\kappa \sim 5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [39], convirtiéndose en el mejor conductor térmico que existe. Esto es debido a los fuertes enlaces covalentes en el plano del grafeno, que permite una propagación eficiente de los fonones [40]. Es importante comentar que,

pese a que esa conductividad se ve reducida drásticamente cuando el grafeno se encuentra soportado sobre un sustrato como el dióxido de silicio ($\kappa \sim 600 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) [41], este valor continúa siendo superior al del cobre o silicio. De acuerdo a estos valores, el grafeno resulta un material atractivo para ser empleado como elemento de disipación de calor en dispositivos electrónicos.

Por otra parte, el grafeno se considera un material químicamente anisótropo, debido a que su reactividad en el plano basal es muy baja (excepto para reacciones de oxidación), mientras que sus bordes son altamente reactivos debido a la presencia de insaturaciones [42]. El grafeno presenta teóricamente una elevada área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [43] y una alta movilidad intrínseca ($200000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [44], propiedades que junto con su elevada conductividad eléctrica, confieren al grafeno un enorme potencial en el desarrollo de sensores electroquímicos de elevada sensibilidad [33,34,45–47]. Además, sus excepcionales propiedades electroquímicas también favorecen su aplicación como material electroactivo en sensores electroquímicos.

2.4. Óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO), conocido desde hace más de un siglo, consiste en una capa aislada de óxido de grafito. En los últimos años ha recibido una gran atención, básicamente debido a que se emplea como material de partida para la preparación de grafeno. El GO es obtenido, generalmente, a partir de la oxidación de grafito en una mezcla ácida y oxidante [48–50]. Esta

oxidación conlleva la rotura parcial de la estructura híbrida sp^2 del grafito y provoca que las capas de carbono se separen [51].

Actualmente, la estructura del GO se encuentra bajo discusión, debido a su naturaleza no estequiométrica. Sin embargo, se conoce que el GO contiene una parte hidrofóbica de la estructura del grafito pristino y una parte hidrofílica formada por grupos funcionales hidroxilo, epoxy, carbonilo y carboxilo [52,53], tanto en el plano basal como en los bordes (Figura 1.4), generados tras el proceso de oxidación.

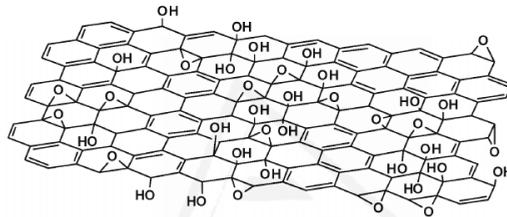


Figura 1.4. Estructura del GO formada por una parte hidrofóbica y una hidrofílica.

Las propiedades electrónicas del GO, dependen fundamentalmente del grado de oxidación y de la composición química. De este modo, las propiedades pueden ser moduladas mediante la eliminación o adición de grupos oxigenados para ajustar la proporción de carbonos sp^2 y sp^3 . De este modo, el GO puede tener carácter semiconductor o aislante, en función del grado de oxidación. Esta rotura parcial de la estructura conjugada de electrones π provoca una disminución de la conductividad eléctrica. Sin embargo, los restantes carbonos con hibridación sp^2 junto con los grupos hidrofílicos incorporados durante el proceso de oxidación, dotan al GO de propiedades únicas. Entre ellas, cabe destacar la afinidad por los anillos aromáticos, junto con una elevada dispersabilidad en disoluciones acuosas y biocompatibilidad, proporcionada por los grupos funcionales ricos en

oxígeno que se han introducido [54]. Además, debido a la gran cantidad de grupos funcionales presentes, el GO puede reaccionar fácilmente con diversos compuestos, con el propósito de mejorar las funcionalidades o de introducir nuevas [25]. Estas propiedades hacen del GO un buen candidato para el desarrollo de sensores y biosensores [54–57].

2.5. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) fueron encontrados por primera vez en los depósitos de carbón de un ánodo de grafito durante un arco de descarga en una atmósfera de helio (He), donde se alcanzaron temperaturas de hasta 2500°C [31]. Los CNTs obtenidos consisten en diferentes capas de carbono, denominados nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, *Multi Walled Carbon Nanotubes*), con diámetros comprendidos entre 1 y 50 nm. Mediante la selección de las condiciones en la descarga de arco entre los electrodos de grafito se ha conseguido sintetizar una gran variedad de nanotubos de carbono [58], siendo los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs, *Single Walled Carbon Nanotubes*) descubiertos posteriormente [59].

La estructura de los CNTs consiste en un cilindro hueco formado al enrollar una o varias láminas de grafeno. Se puede realizar una primera clasificación de los CNTs en función del número de láminas de las que están compuestos, dando lugar a los SWCNTs y MWCNTs. Ambas clases comprenden compuestos de diferentes diámetros y longitudes [60]. Además de las dimensiones, las propiedades de estos materiales están definidas por la

forma en la que la lámina de grafeno está enrollada o de si los tubos están cerrados en sus extremos o no [26,60].

En el caso de los MWCNTs existe un número de variaciones morfológicas posibles en función de las condiciones y del método de preparación de los CNTs [61]. De acuerdo a cómo se encuentran apilados los diferentes nanotubos, los MWCNTs pueden tener una estructura de espina de pescado (*herringbone*) [62], *bamboo* [63], o de tubo-hueco [42], estando las tres esquematizadas en la Figura 1.5. Además, las estructuras *herringbone* y de tubo hueco pueden presentar los extremos abiertos o cerrados.

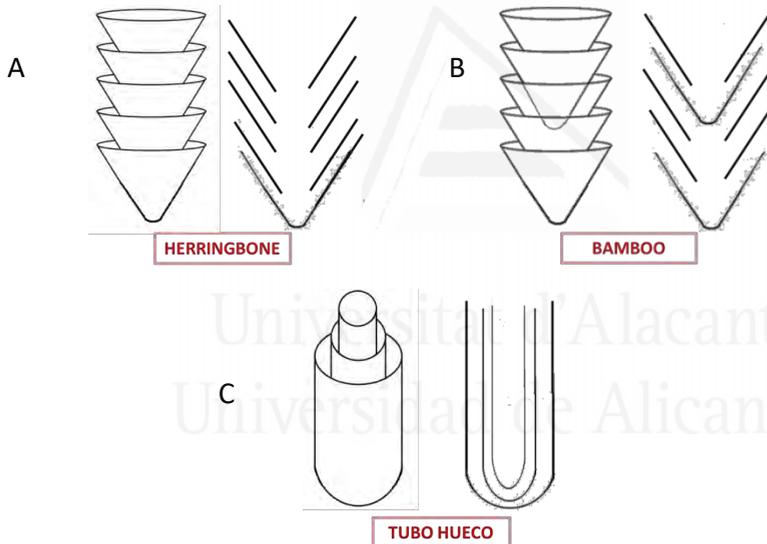


Figura 1.5. Clasificación de los MWCNTs de acuerdo a su estructura: A) *herringbone*. B) *Bamboo*. C) Tubo hueco.

Los CNTs presentan excelentes propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas derivadas de su estructura ordenada y del carácter predominantemente sp^2 de sus enlaces. Debido a su tamaño y estructura, así como las interacciones existentes entre los nanotubos, son difícilmente

dispersables tanto en medios acuosos como orgánicos. No obstante, existen diversas estrategias para obtener suspensiones estables de CNTs, como la dispersión en disolventes con grupos amino o amida junto con la aplicación de ultrasonidos [64]. El modo más efectivo consiste en la funcionalización no covalente de los nanotubos mediante el empleo de surfactantes. Éstas son moléculas ambifílicas que se organizan alrededor de los nanotubos a través de interacciones con su parte hidrofóbica, mientras que los grupos hidrofílicos quedan orientados hacia la disolución, facilitando la dispersión del material carbonoso [26]. Además, la química de estos materiales hace también posible la modificación covalente de los mismos, mediante las cuales se pueden introducir heteroátomos en la estructura de la lámina de grafeno. Esto, además de mejorar la dispersabilidad de los CNTs, puede emplearse para modificar el carácter conductor con dopados tipo p o n del nanotubo, como en el caso del dopado con nitrógeno (N) [65–68] o boro (B), que puede aportar electrones o generar huecos, respectivamente. Además, la introducción de heteroátomos, o los procesos de oxidación a los que son sometidos durante la funcionalización, pueden generar defectos en los nanotubos, mejorando la actividad electrocatalítica de los mismos en diversas reacciones [42,61].

Los CNTs presentan un gran potencial para su aplicación en electrónica, sensores y medicina debido a sus excelentes propiedades eléctricas, mecánicas y de biocompatibilidad [60]. Además, debido a su elevada conductividad y resistencia química y electroquímica, han sido ampliamente empleados para el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos

[69], así como en aplicaciones de almacenamiento y producción de energía eléctrica [70].

2.6. Funcionalización de materiales carbonosos

La funcionalización de los materiales carbonosos tiene como principal propósito modular su reactividad, estabilidad física y química, estructura y por ende, las posibles aplicaciones de estos materiales. La química superficial de los materiales carbonosos es determinante en las propiedades físico-químicas y en sus aplicaciones. Esta química superficial está definida en gran parte, por la presencia de distintos heteroátomos (oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S) y boro (B), entre otros) que forman diferentes funcionalidades en su superficie. Estos heteroátomos pueden estar presentes en el material carbonoso de forma natural o bien pueden ser introducidos durante su preparación o mediante tratamientos posteriores.

Por otra parte, todos los materiales carbonosos disponen de sitios activos donde pueden formarse enlaces covalentes entre moléculas adicionadas y la superficie del material carbonoso, formando un nuevo grupo funcional anclado a la superficie. La reactividad de los materiales carbonosos viene determinada por la relación entre el número de átomos del plano basal (sitios activos poco reactivos) y el de los bordes (sitios activos muy reactivos) [71], que permite estimar las posibilidades de formar funcionalidades covalentemente ancladas a la superficie. No obstante, el plano basal de los materiales carbonosos no es inactivo, ya que tiene una alta densidad electrónica π , lo que incrementa el potencial de adsorción del grafeno [72],

y permite la funcionalización no covalente, además de dotar de cierta basicidad a la superficie del material carbonoso [73].

La Figura 1.6 muestra la clasificación de las técnicas más empleadas para funcionalizar materiales carbonosos. A grandes rasgos, se clasifican en técnicas químicas y electroquímicas, dentro de las que se pueden encontrar métodos de funcionalización covalente y no covalente.

2.6.1. Funcionalización química de materiales carbonosos

2.6.1.1. Métodos de funcionalización no covalente

Este tipo de funcionalización se emplea cuando se desea mantener la conjugación de los materiales carbonosos nanoestructurados, lo que resulta necesario en determinadas aplicaciones [75,76]. Diversos materiales carbonosos se han funcionalizado no covalentemente empleándose para ello nanopartículas metálicas [47], polímeros [77] y surfactantes [78], entre otros. Las interacciones entre la molécula y la superficie del material carbonoso se dan entre el sistema π de su estructura y los ligandos que contienen hidrógeno, cationes, aniones o electrones π en la estructura de la molécula, lo que conlleva implicaciones energéticas y geométricas [76].

La fortaleza de la funcionalización no covalente viene determinada por la combinación de los efectos electrostáticos, dispersivos, inductivos y las fuerzas de repulsión, y además se basa en gran medida en el sistema de electrones π deslocalizados en la estructura del material carbonoso. Por tanto, la funcionalización no covalente tiene un gran interés en aquellos materiales con una estructura ordenada y una extensa superficie aromática expuesta, como los CNTs [75,79] o el grafeno [80,81].

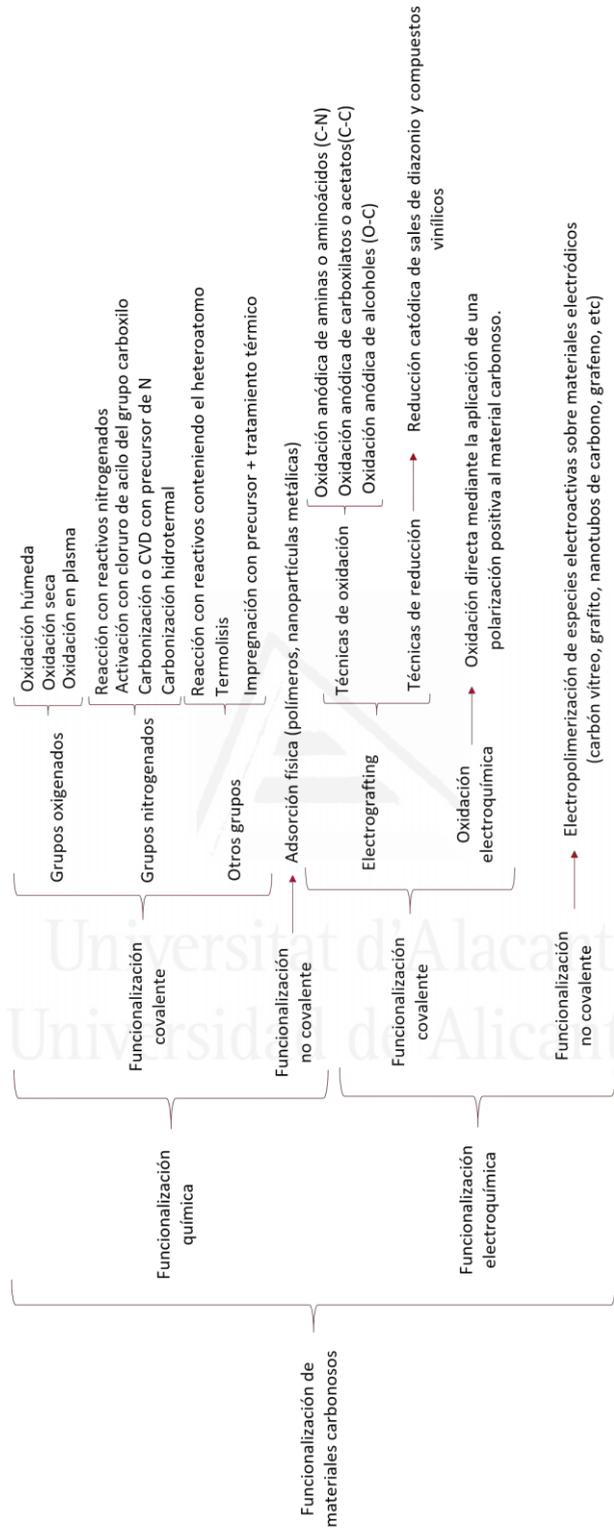


Figura 1.6. Esquema de las técnicas de funcionalización de materiales carbonosos (Fuente: Ref. [74]).

La funcionalización de materiales carbonosos con nanopartículas metálicas preparadas mediante síntesis química también ha sido ampliamente estudiada. Existen diversos modos de llevar a cabo esta síntesis, entre ellos, llevar a cabo la adsorción de la sal de un metal sobre la superficie del material carbonoso y reducir a continuación la sal a elevadas temperaturas y bajo una atmósfera de hidrógeno (H_2) o argón (Ar). Este método ha sido empleado de forma exitosa en la síntesis de nanopartículas de Pt (Pt-NPs) [82], platino-rutenio (Pt-Ru) [83] y paladio (Pd) [84], así como en la síntesis de Pt-NPs (Capítulo 3) [47] y de nanopartículas de Au (Au-NPs, Capítulo 4) de la presente Tesis Doctoral. Finalmente, hacer mención al método de depósito no electrolítico, ya que consiste en uno de los métodos más sencillos y efectivos empleados para fabricar nanopartículas metálicas. Este método está basado en un proceso químico donde una especie química, cuyo potencial redox es convenientemente inferior al de la especie metálica que se reduce, proporciona la fuerza motriz para que la reacción tenga lugar [85]. Este método se ha empleado sobre todo para sintetizar Pt-NPs [86], aunque también se han conseguido sintetizar Au-NPs y nanopartículas de plata (Ag-NPs) [86], entre otras.

2.6.1.2. Métodos de funcionalización covalente

Los métodos de funcionalización covalente suponen la adición de heteroátomos o moléculas al material carbonoso, siendo este tipo de métodos aplicable a todos los materiales carbonosos nanoestructurados, entre ellos CNTs o grafeno [81,87]. Además, la incorporación de átomos como oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo [88–90], ha sido ampliamente

estudiada, debido a que las funcionalidades generadas resultan útiles para determinadas aplicaciones. Existen estudios de oxidación en negro de carbón, carbón activado, fibras de carbón activadas y grafito [91–93], modificación química de electrodos de carbón [94], inmovilización de enzimas sobre carbón vítreo (GC, *Glassy Carbon*) [95], etc. La investigación de los métodos de funcionalización de CNTs [88,96–98] y grafeno [76,81,88,99–101] ha sido especialmente amplia. Sin embargo, los estudios realizados indican que la selectividad de los métodos químicos para la funcionalización de materiales carbonosos con heteroátomos es baja.

2.6.2. Funcionalización electroquímica de materiales carbonosos

El uso de técnicas electroquímicas presenta ciertas ventajas con respecto a los métodos químicos de funcionalización, ya que los procedimientos son sencillos de aplicar y controlar y además pueden interrumpirse en el momento deseado. Otra de las ventajas que presentan es que pueden realizarse a temperatura ambiente y presión atmosférica y empleando pequeñas cantidades de reactivos. Además, las condiciones experimentales pueden ser reproducidas con gran precisión y desde el punto de vista analítico son métodos altamente sensibles y selectivos [102,103].

A continuación, se indican las técnicas electroquímicas normalmente empleadas para llevar a cabo la funcionalización de los materiales carbonosos:

- Métodos potencioestáticos, en los que el electrodo es sometido a un potencial constante.

- Métodos potenciodinámicos, donde el electrodo es sometido a un barrido de potenciales con el tiempo.
- Métodos galvanostáticos, en los que el electrodo es sometido a una intensidad de corriente constante.

Estas técnicas han sido aplicadas tanto para llevar a cabo una funcionalización covalente como no covalente [104,105]; la diferencia reside en el tipo de reactivos empleados durante la modificación del material carbonoso.

2.6.2.1. Funcionalización no covalente

Mediante el empleo de métodos electroquímicos se ha conseguido el crecimiento de manera controlada de películas delgadas de un polímero sobre el material carbonoso. La formación del polímero tiene lugar mediante la formación de radicales del monómero presente en la disolución, generalmente a través de la oxidación electroquímica del mismo, dando lugar a un radical-catión. Este radical provoca el proceso de nucleación y crecimiento del polímero, el cual puede interactuar con la superficie del electrodo, formando una película que lo recubre. Las películas poliméricas formadas suelen interactuar de forma no covalente, aunque es posible que ocurra el anclaje de monómeros en la superficie o a través de funcionalidades ya existentes [103]. La PANI es el polímero más empleado para la funcionalización no covalente, habiendo sido depositada, por ejemplo, sobre GC y fibras de carbón activadas [106], con aplicaciones en supercondensadores.

Teniendo en cuenta el reciente interés desde el punto de vista electroquímico en el uso de algunos materiales carbonosos, como los CNTs, así como su uso como soporte de nanopartículas metálicas, no resulta extraño encontrar diversos ejemplos de funcionalización de materiales carbonosos con nanopartículas metálicas mediante el depósito electroquímico controlado de las mismas sobre los materiales [85,107]. Se ha conseguido llevar a cabo el electrodeposición de metales nobles como Pd [108,109], Pt [107,110,111], Au [112], Ag [113] y Pt-Ru [114,115]. Para llevar a cabo la síntesis se hace uso de un sistema electroquímico de 2 o 3 electrodos, donde el electrolito soporte debe contener al precursor metálico. Este electrodeposición puede llevarse a cabo mediante dos modos distintos: manteniendo el potencial constante sobre el electrodo de trabajo o haciendo pasar una intensidad de corriente constante [107].

El empleo de las técnicas electroquímicas para la funcionalización con nanopartículas metálicas, permite además, someter al material carbonoso a un proceso de oxidación previa para poder introducir los grupos funcionales oxigenados necesarios para que se adhieran las nanopartículas metálicas [109]. Además mediante esta técnica es posible hacer crecer CNTs en la superficie de un material electródico, el cual se encuentra conectado a un potencióstato y posteriormente realizar el electrodeposición de las nanopartículas metálicas [112,113].

2.6.2.2. Funcionalización covalente

Los materiales carbonosos pueden funcionalizarse mediante un tratamiento electroquímico que implique una transferencia de electrones o una reacción

farádica, formándose un enlace covalente entre la superficie del material carbonoso y una molécula disuelta, un ion del electrolito o incluso moléculas del disolvente [116]. De este modo es posible incorporar una gran variedad de grupos funcionales a la estructura del material carbonoso, dando lugar a materiales con distintas propiedades superficiales. El anclaje electroquímico puede llevarse a cabo mediante técnicas de reducción (reducción de sales de diazonio y compuestos vinílicos [116], entre otros) o de oxidación (anclaje de aminas, carboxilatos y alcoholes [116]), dependiendo del tipo de funcionalización deseado. Un ejemplo del uso de estas técnicas es la modificación de nanotubos de carbono *herringbone* (hCNTs) con el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA) [65], síntesis que ha sido utilizada en la presente Tesis Doctoral (Capítulo 5).

Otro tipo de funcionalización covalente, investigada desde hace décadas, es la oxidación electroquímica de materiales carbonosos, que se entiende como el proceso responsable de la generación de grupos oxigenados en la superficie de trabajo mediante la aplicación de una polarización positiva al mismo [117,118].

2.7. Materiales carbonosos nanoestructurados en sensores y biosensores

El grafeno y sus análogos, como GO o CNTs han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de sensores electroquímicos en los últimos años. El rápido crecimiento del uso de estos materiales en este área es gracias, entre otros factores, a las propiedades físicas y electroquímicas que éstos poseen [33]. Además, la incorporación de nanopartículas metálicas ha supuesto una gran

variedad de aplicaciones analíticas. El pequeño tamaño de las nanopartículas define las extraordinarias propiedades químicas [119], físicas [120,121] y electrónicas que las caracteriza, siendo muy diferentes de las correspondientes a esos mismos materiales másicos, lo que ha hecho que adquieran un gran interés. Gracias a esas propiedades, una de las principales aplicaciones de estos materiales ha sido en electroanálisis y en sensores electroquímicos [122]. Por ejemplo, el Pt es uno de los metales más extensamente estudiados en electroquímica debido a que es relativamente inerte químicamente, proporciona ventanas de potencial suficientemente amplias, y además tiene la capacidad de catalizar diversas reacciones redox, entre ellas las reacciones de reducción y oxidación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [122].

Además, la aparición de los materiales a nanoescala mencionados anteriormente ha facilitado en gran medida el desarrollo de biosensores nanoestructurados con altas prestaciones, donde los dos materiales carbonosos nanoestructurados más empleados han sido el grafeno y los CNTs. Varios estudios afirman que el uso de estos materiales como elemento transductor mejora la reactividad electroquímica de las biomoléculas, debido a que promueven las reacciones de transferencia electrónica entre la biomolécula y el analito, mejorando por tanto, su sensibilidad [123,124]. Para favorecer la inmovilización del receptor (enzima), es habitual acudir a estrategias de funcionalización de estos materiales, ya que los grupos introducidos pueden favorecer el anclaje de la enzima mediante enlaces covalentes u otro tipo de interacciones [125]. Por ejemplo, se han empleado Pt-NPs para la determinación de glucosa

mediante el uso de la glucosa oxidasa (GOx), ya que diversos estudios indican que esta enzima se adsorbe fácilmente sobre Pt [122], películas de carbono modificadas con Pt-NPs [126] o sobre los CNTs dopados con Pt-NPs [127,128].

La elevada capacidad transductora de señal alcanzada por los CNTs es debida a su elevada conductividad eléctrica, que les confiere una elevada cinética de transferencia de carga; a su pequeño tamaño, similar al de las enzimas empleadas en los biosensores; a su interesante comportamiento electroquímico, el cual presenta una elevada sensibilidad por su gran área superficial, y a la presencia de sitios de elevada actividad en los bordes y extremos de los CNTs; y, a la gran disponibilidad de técnicas que pueden ser empleadas para introducir grupos funcionales tanto en los planos basales como en los bordes [6].

Por ello, no resulta extraño que en la última década hayan sido desarrollados un gran número de biosensores electroquímicos donde los CNTs son utilizados como elemento transductor, empleando nanopartículas metálicas y enzimas como elementos receptores de los mismos.

3. Analitos de interés clínico estudiados

3.1. Ácido ascórbico

3.1.1. Características generales del ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico (AA, $C_6H_8O_6$), también conocido como Vitamina C, es una vitamina hidrosoluble y antioxidante, que contiene una estructura δ -

lactona, siendo fisiológicamente activo el enantiómero L. Además, contiene dos protones disociables, con valores de pK_a 4.17 y 11.57 [129] , por lo que en condiciones fisiológicas ($pH \approx 7$) se encuentra como anión monoascorbato [130] (Figura 1.7).

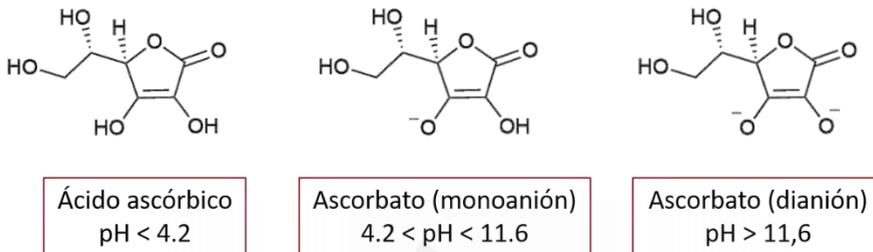


Figura 1.7. Diferentes formas del AA en función del pH.

La síntesis de AA en mamíferos tiene lugar en el hígado, donde la enzima L-gulonolactona oxidasa cataliza la reacción de glucosa a AA. Sin embargo, debido a una mutación que provoca una deficiencia de dicha enzima en humanos, no somos capaces de sintetizar AA. La importancia de este analito en las funciones metabólicas humanas hace necesaria su incorporación en la dieta [131]. Por esta razón, entre otras, el AA puede encontrarse en una gran variedad de productos alimentarios, bebidas y fármacos.

Entre las principales propiedades del AA cabe destacar su gran capacidad antioxidante, siendo fácilmente oxidado para formar el radical ascorbato y ácido dehidroascórbico (DHA). Sus propiedades reductoras permiten su uso en enfermedades inducidas por radicales libres [132–134].

Además, los niveles de este analito en fluidos fisiológicos son de gran importancia, debido por una parte a su participación como antioxidante, y como cofactor en diversas reacciones enzimáticas [135,136], como la

síntesis de catecolaminas y su activación y producción de colágeno [137], y también debido a su participación en la absorción de hierro, en la cicatrización de heridas y ayuda en el mantenimiento de capilares, huesos y dientes [132–134]. Además de lo mencionado anteriormente, la detección y cuantificación de este analito en fluidos humanos es de gran importancia debido a que niveles anormales de AA se relacionan con diversas enfermedades. La Tabla 1.1 muestra los niveles normales de AA determinados en los diferentes fluidos fisiológicos.

Tabla 1.1. Niveles normales de AA en fluidos fisiológicos.

Fluido	Niveles de AA	Ref.
Sangre	(30-90) μM	[138]
Orina	132 μM	[139]
Sudor	(0.11-36) μM	[140]
Saliva	(0.04-0.05) mM	[141]

La deficiencia de AA se ha relacionado con la irritación gástrica [142], y también se han encontrado niveles bajos de AA en pacientes que han sufrido un derrame cerebral [143]. Además, un exceso de AA provoca que uno de sus metabolitos, el ácido oxálico, genere problemas renales [144,145].

En los últimos años se ha investigado la posible relación del AA en el tratamiento contra el cáncer, debido a la capacidad del AA para oxidarse produciendo H_2O_2 ; propiedad que puede ser empleada para la liberación de H_2O_2 en tumores [146–149].

3.1.2. Determinación de AA mediante métodos no electroquímicos

Para llevar a cabo la detección y cuantificación del AA se usan una gran variedad de métodos. Entre ellos, cabe destacar los siguientes:

- Valoraciones con una disolución oxidante: Diclorofenol indofenol [150], yodato potásico [151] o bromato potásico [152].
- Métodos cromatográficos, como cromatografía líquida [153–155], particularmente con detección electroquímica [156,157].
- Métodos fluorimétricos basados en la reacción del DHA con o-fenilendiamina con un estricto control del pH [158].
- Métodos basados en la medida de la absorbancia UV-Vis [159].
- Seguimiento espectrofotométrico de la reacción del AA con hexacianoferrato (III) [160–162], de la oxidación del AA mediante el complejo Cu(II)-neocuprona [163].
- Quimioluminiscencia [164].

3.1.3. Determinación de AA mediante métodos electroquímicos

El mecanismo de oxidación del AA ha sido ampliamente estudiado, y a valores de pH inferiores a 8 viene descrito por una transferencia electrónica reversible acoplada a una reacción química irreversible, dando lugar a un proceso global irreversible. Las reacciones que tienen lugar están representadas en la Figura 1.8.

Como puede observarse en la Figura 1.8, la reacción de oxidación del AA conlleva la liberación de dos electrones y dos protones, para producir DHA,

seguida de una reacción irreversible de solvatación [165]. Esta reacción, mediante la apertura del anillo lactona del DHA [149,166–170] da lugar a ácido 2,3-dicetoglucónico, producto que es inactivo electroquímicamente y que además se adsorbe fácilmente en la superficie del electrodo, ocasionando el bloqueo de los sitios activos del mismo [171–173].

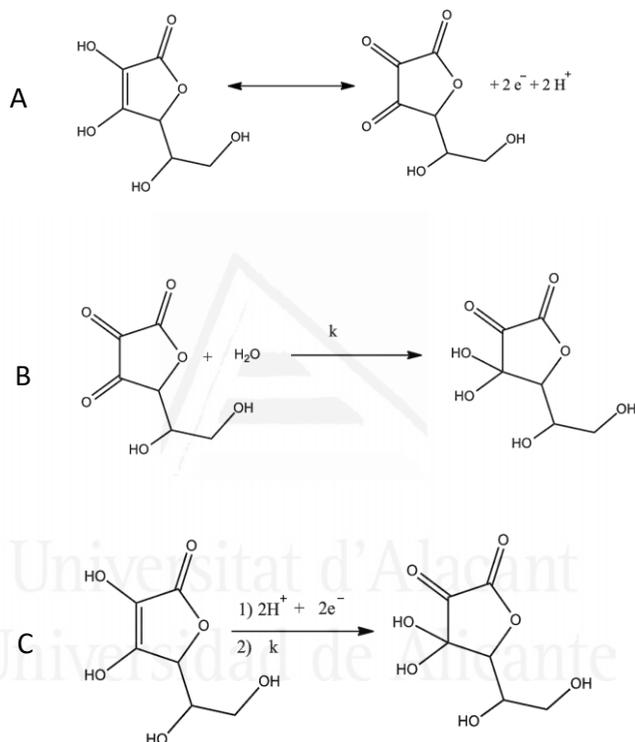


Figura 1.8. Reacciones de oxidación del AA. A) Reacción de oxidación reversible. B) Reacción de hidrólisis irreversible. C) Reacción global irreversible.

La detección y cuantificación de AA mediante técnicas electroquímicas se ha llevado a cabo haciendo uso de una gran variedad de materiales electródicos, entre ellos materiales que contienen Pt [174–179] u Au [180,181], existiendo una gran variedad de sensores para AA basados en materiales carbonosos [47,182–190]. En la introducción correspondiente a

los capítulos 4 y 5 de la presente Tesis Doctoral puede encontrarse una revisión más amplia de los materiales carbonosos empleados en el desarrollo de sensores electroquímicos para la determinación de AA.

3.2. Ácido úrico

3.2.1. Características generales del ácido úrico

El ácido úrico (UA, 2,6,8-trihidroxipurina) es un ácido débil con un valor de pK_a de 5.8 [191], encontrándose por tanto, como urato sódico en los fluidos biológicos ($pH \approx 7$). Además, son poco solubles en disoluciones acuosas. Es el producto mayoritario del metabolismo de purinas, obtenido a partir de una reacción catalizada por la enzima xantina oxidasa. Alrededor de 350 mg de UA se producen diariamente por el organismo, mientras que unos 300 mg son incorporados en la dieta. En la mayoría de mamíferos, el UA es posteriormente degradado a alantoina mediante la enzima urato oxidasa (uricasa), siendo posteriormente expulsada del cuerpo mediante la orina (≈ 800 mg/día) [191].

En la Tabla 1.2 se muestran los valores normales de concentración de UA en los fluidos fisiológicos. Las concentraciones de UA en sangre superiores o inferiores a los niveles normales se han relacionado con diversas enfermedades. Por ejemplo, niveles elevados de UA han sido asociados a enfermedades como gota [192], hiperuricemia [193], enfermedad de Lesch-Nyan [194], obesidad [195,196], diabetes [197], elevado colesterol [194], elevada presión sanguínea [198] y enfermedades renales y coronarias [199–201]. Además, concentraciones de UA inferiores a los niveles normales se han relacionado con enfermedades como: esclerosis múltiple [202],

Parkinson [203], Alzheimer [204] y neuritis óptica [205]. Desde que el UA ha sido considerado un marcador de estas enfermedades, conocer su concentración en fluidos biológicos presenta un gran interés ya que este dato puede ser empleado como una posible señal de alerta con respecto a este tipo de trastornos médicos. Pero además, estudios más recientes indican que el UA podría tener un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades, lo que presenta la posibilidad de manipular las concentraciones de UA para el tratamiento de dichos trastornos médicos. Esto hace aún más interesante el desarrollo de métodos de análisis capaces de cuantificar los niveles de UA en fluidos fisiológicos humanos.

Tabla 1.2. Niveles normales de UA en fluidos fisiológicos.

Fluido	Niveles de AA	Ref.
Sangre	(120-380) μM	[206]
Orina	(1.4-4.7) mM	[207]
Sudor	(4.2-4800) μM	[140]
Saliva	200 μM	[208]
Lágrimas	326 μM	[209]

Existen diversos métodos para llevar a cabo la determinación de UA en muestras biológicas, entre ellos:

- Método fotométrico basado en la reducción de ácido fosfowolfrámico mediante el UA para dar azul de wolframio [210,211].

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con un espectrofotómetro ultravioleta (UV) [212,213] o un espectrómetro de masas (MS) [214].
- Métodos enzimáticos basados en la enzima uricasa [215,216].

Además, en las últimas décadas, el desarrollo de sensores electroquímicos para la determinación de UA está siendo ampliamente investigado, debido a las excepcionales características que presentan este tipo de dispositivos.

3.2.2. Determinación de UA mediante métodos enzimáticos

Los métodos empleados para la determinación de UA en análisis de rutina en suero están basados en el uso de la enzima uricasa. El UA es oxidado enzimáticamente por el oxígeno molecular (O_2) para dar H_2O_2 , alantoína y dióxido de carbono (CO_2) [217]. La reacción que tiene lugar se muestra en Figura 1.9.



Figura 1.9. Reacción de oxidación del UA catalizada por la enzima uricasa.

La clasificación de estos métodos se realiza, por un lado, en función de la sustancia que se va a cuantificar. El método directo de la uricasa, se basa en la cuantificación del UA mediante la medida de su absorbancia a 293 nm, mientras que el método indirecto está basado en la cuantificación de H_2O_2 mediante diversos modos [217]. Una segunda clasificación, de acuerdo al método empleado para procesar los datos, incluye el método cinético y el

método de equilibrio. Por tanto, combinando ambas clasificaciones existen cuatro métodos enzimáticos diferentes.

En los laboratorios clínicos es bastante habitual el uso del método uricasa indirecto de equilibrio para los análisis rutinarios de la concentración de UA en muestras de suero. Éste, está basado en la cuantificación de H_2O_2 , generalmente mediante el uso de una segunda enzima, en este caso una peroxidasa. Estas enzimas catalizan la oxidación de cosubstratos con la respectiva reducción del H_2O_2 . El ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico junto con 4-aminofenazona [218], azur-D2 [219] y o-fenilendiamina [220], han sido empleados de forma exitosa como cosubstratos de las peroxidasas. Mediante este método se obtiene una relación directamente proporcional entre la absorbancia medida (producida por el cosubstrato empleado) y la concentración inicial de UA en la disolución [217].

El principal problema que entrañan estos métodos es que suelen incluir múltiples etapas, incluyendo la preparación de la muestra, y se requieren métodos espectroscópicos para identificar el producto [221]. Además, cuando la detección de UA se lleva a cabo en muestras de sangre, ésta ha de ser desnaturalizada a suero para evitar resultados erróneos. Esto se traduce en un aumento del tiempo de análisis, mientras que la necesidad de usar métodos de detección conlleva un mayor coste y complejidad. Debido a esto, el desarrollo de métodos simples y rápidos para la determinación de UA en análisis de rutina es de gran interés [194].

3.2.3. Determinación de UA mediante métodos electroquímicos

La oxidación electroquímica de UA ha sido ampliamente estudiada en un amplio rango de valores de pH (1.5-9.5) [222]. Ésta tiene lugar mediante la pérdida de dos electrones y dos protones para dar lugar a una diimina inestable. La Figura 1.10 muestra el mecanismo propuesto para la oxidación de UA a pH neutro. El urato (I) sufre una reacción de oxidación donde se transfieren dos electrones, dando lugar a un compuesto quinónico, aniónico e inestable (II y III). A $\text{pH} \geq 6$ tienen lugar dos reacciones nucleófilas de adición de agua (H_2O) a la forma quinónica (IV y V), seguida de una reacción de descomposición que da lugar a la alantoína (VI) [222].

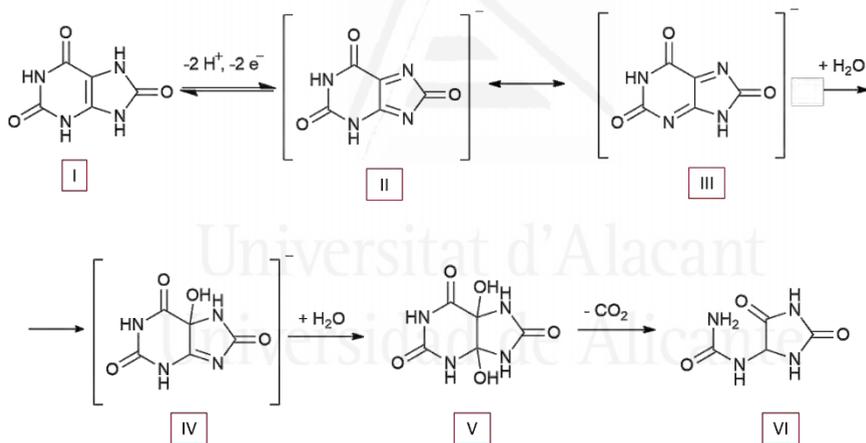


Figura 1.10. Reacción de oxidación de UA a alantoína a $\text{pH} \geq 6$ (Fuente: Ref. [194]).

Los puntos clave de esta reacción son la adsorción de urato en el electrodo y la adición nucleófila de H_2O a la forma quinóide.

Debido a las ventajas que supone emplear técnicas electroquímicas, la oxidación electroquímica de UA ha sido ampliamente estudiada sobre diferentes materiales electródicos, incluyendo Pt, Au, GC [223] y otros

materiales carbonosos [224]. El principal problema que presenta la determinación de UA mediante técnicas electroquímicas es la presencia de AA, entre otros compuestos, en la muestra, ya que esta especie se oxida a potenciales muy cercanos a los que tiene lugar la oxidación de UA. Además, ambos analitos coexisten en la mayoría de fluidos biológicos, resultando por tanto un interferente en la cuantificación de UA [223]. No obstante, el desarrollo de nuevos materiales y la modificación de los materiales existentes ha permitido el desarrollo de sensores capaces de cuantificar UA en presencia de AA [47,225], o incluso de determinar simultáneamente la concentración de ambos en diversas matrices biológicas [190,226–231], convirtiéndose en una alternativa competitiva al método enzimático empleado en los laboratorios clínicos, mejorando tanto el tiempo de análisis como las sensibilidades y los límites de detección [232]. Una revisión bibliográfica más completa sobre los materiales carbonosos empleados para el desarrollo de sensores de UA puede encontrarse en los capítulos 3-5.

3.3. Glucosa

3.3.1. Características generales de la glucosa

La glucosa es el monosacárido más abundante en la naturaleza, es soluble en agua e insoluble en etanol y en éter, y además tiene apariencia cristalina y blanca [233]. Cuando la glucosa se disuelve en agua, ésta puede encontrarse como uno de los tres isómeros que se conocen, denominados α -glucosa, β -glucosa y δ -glucosa [234] (Figura 1.11).

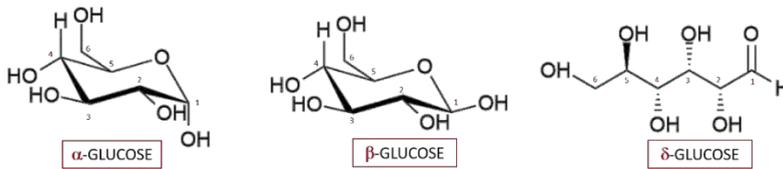


Figura 1.11. Isómeros de la glucosa a pH 7.0.

La α -glucosa se interconvierte en β -glucosa mediante hidrólisis ácida, siendo la δ -glucosa el intermedio de reacción. A temperatura ambiente y en equilibrio, estos isómeros están presentes en una relación 37:63:0.003 para la α -, β - y δ -glucosa [234], respectivamente, lo que indica que la glucosa es más estable en su estructura cíclica [235].

Entre todos los compuestos biológicos encontrados en la naturaleza, la glucosa es, indudablemente, uno de los más importantes para la vida. Es el combustible principal para la glucólisis y las vías descendentes de la respiración aeróbica y anaeróbica, y es responsable de generar gran parte del potencial energético necesario para el crecimiento [234]. Además, la importancia de este analito reside en su relación con la enfermedad diabetes mellitus. Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo, y consiste en una deficiencia de insulina que se ve reflejada en los niveles de glucosa en sangre, así como en los niveles de este analito en otros fluidos fisiológicos. Por tanto, debido a su relación con enfermedades como la diabetes o la hipoglucemia, su detección y cuantificación en fluidos fisiológicos ha sido ampliamente estudiada [236]. A continuación, en la Tabla 1.3, se muestran los niveles normales de glucosa existentes en los principales fluidos fisiológicos para personas sanas.

Tabla 1.3. Niveles normales de glucosa en fluidos fisiológicos.

Fluido	Niveles de glucosa	Ref.
Sangre	(4.4-6.6) mM	[236]
Orina	(2.8-5) mM	[237]
Sudor	5.6 μ M-2.2 mM	[140,238]
Saliva	(20-240) μ M	[239]
Lágrimas	(0.2-0.8) mM	[237]

3.3.2. Biosensores electroquímicos de glucosa

La detección y cuantificación de glucosa se lleva a cabo en la gran mayoría de casos, mediante el empleo de biosensores, debido a la gran sensibilidad y selectividad que presentan este tipo de dispositivos. Estos biosensores están basados en el uso de la GOx, una enzima perteneciente al grupo de las oxidoreductasas. Dentro de este mismo grupo, también se hallan las enzimas denominadas glucosa deshidrogenasas, empleadas en menor medida que la GOx [240]. La GOx es una proteína dimérica compuesta por dos subunidades idénticas, donde cada subunidad se pliega en dos dominios: uno para enlazar el sustrato (β -D-glucosa), y otro en el que se encuentra enlazado no covalentemente el cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD). El cofactor FAD constituye el centro activo donde tiene lugar la reacción de oxidación de la glucosa y está formado por grupos amino que tienen un papel importante en la actividad catalítica de la oxidación de glucosa. Además, la enzima está compuesta por diferentes cadenas de

proteínas y carbohidratos que se encuentran cubriendo la propia enzima [240,241] (Figura 1.12).

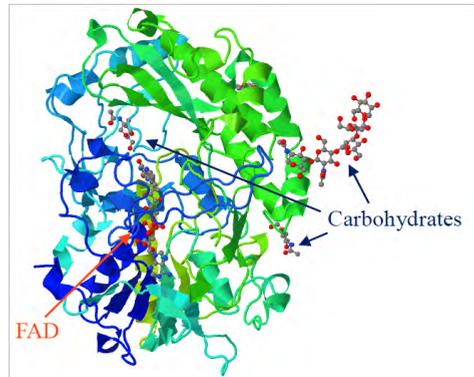
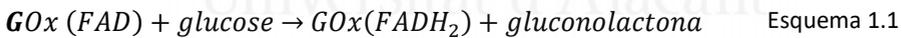


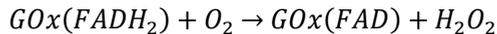
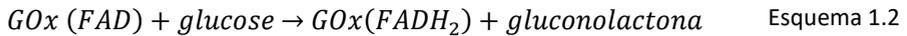
Figura 1.12. Estructura de la glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger* (Fuente: Ref. [242]).

Esta flavoproteína cataliza la reacción de la β -D-glucosa en su grupo hidroxilo, produciéndose gluconolactona [236] (Esquema 1.1) con la consecuente reducción del grupo FAD, obteniéndose la forma reducida de la enzima ($FADH_2$).



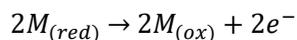
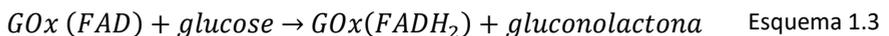
Los biosensores desarrollados para la determinación de glucosa se clasifican en tres tipos, que se diferencian, a grandes rasgos, en el cofactor utilizado para oxidar la GOx ($FADH_2$) a su estado inicial (FAD) [243–245]. A continuación, se describen de forma más detallada la clasificación de estos biosensores.

- Biosensores de primera generación: basados en el uso del oxígeno molecular (cofactor natural) para regenerar el estado inicial de la enzima (GOx(FAD)), con la consecuente generación de H₂O₂ (Esquema 1.2).



Por consiguiente, estos biosensores determinan la concentración de glucosa mediante la cuantificación del O₂ consumido o del H₂O₂ generado, que puede cuantificarse mediante su oxidación o reducción electroquímica.

- Biosensores de segunda generación: el O₂ es sustituido por un aceptor de electrones (cofactor o mediador que se adiciona) (Esquema 1.3). Este cofactor ha de poseer la capacidad de transportar electrones desde el centro redox de la enzima a la superficie del electrodo, ya que la transferencia directa de electrones entre la GOx y los electrodos convencionales no es posible, debido al gran tamaño de la GOx y a las diversas cadenas de su estructura que actúan de barrera.



Emplear un cofactor adecuado es imprescindible en este tipo de biosensores, debido a que la transferencia electrónica entre los sitios activos

de la GOx y la superficie del electrodo es el factor limitante en los biosensores amperométricos de glucosa. El ferroceno, ferrocianuro, sales orgánicas conductoras, compuestos quinónicos y complejos con metales de transición, entre otros, han sido empleados con éxito en el desarrollo de biosensores de glucosa de segunda generación [246,247].

- Biosensores de tercera generación: en estos biosensores se pretende eliminar el uso de mediadores y desarrollar materiales sin ningún cofactor adicional que puedan operar a bajos potenciales, cercanos al potencial redox de la enzima. En estos sistemas, el objetivo es conseguir la transferencia directa de los electrones entre el centro activo de la GOx y la superficie del electrodo. De este modo se conseguiría mejorar la selectividad del dispositivo, eliminando las interferencias debidas a la presencia de otros compuestos. Sin embargo, aún se investiga el desarrollo de nuevas estrategias de funcionalización e inmovilización para evitar las dificultades en la transferencia de electrones debidas a los impedimentos espaciales de la enzima. Esto provoca que actualmente no haya una conclusión clara sobre si esta transferencia directa de electrones es o no posible [245,248].

3.3.3. Sensores electroquímicos de glucosa

Pese a las ventajas que presenta el uso de los biosensores en la determinación de glucosa, el empleo de enzimas conlleva también ciertas desventajas (estabilidad, condiciones de trabajo (temperatura, presión, etc.) y diversos factores limitados por las características de la enzima), por

las cuales la detección de glucosa con sensores ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas.

De acuerdo a algunos autores, los sensores no enzimáticos de glucosa llegarán a convertirse en la cuarta generación de sensores de glucosa con aplicaciones analíticas [249], eliminando los inconvenientes existentes en los biosensores. Sin embargo, aún se requieren grandes esfuerzos en el estudio de los mecanismos de reacción, que tienen cinéticas demasiado lentas para observar intensidades de corriente significativas [250].

Existe un gran número de catalizadores no enzimáticos, siendo la gran mayoría de ellos metales y materiales carbonosos. Existen dos modelos que tratan de explicar cómo tiene lugar la oxidación electroquímica de glucosa en estos catalizadores. El primero de ellos se basa en que el proceso de electrocatálisis tiene lugar mediante la adsorción de la glucosa en la superficie del electrodo [251]. El otro modelo, se propone para explicar el papel de los radicales hidroxilo en la oxidación de glucosa debido a que se ha observado que el potencial al cual se oxida la glucosa coincide con el potencial de adsorción del hidroxilo (OH_{ads}) [252–255], actuando este como mediador en la oxidación de glucosa (*IHOAM, Incipient Hydrous Oxide Adatom Mediator*) [256]. Los átomos metálicos de la superficie del electrodo sufren una etapa de oxidación previa a la formación de la monocapa que da lugar a una capa de hidroxilos reactivos (OH_{ads}) que actúan como mediadores en la reacción de oxidación.

El mecanismo de la oxidación electroquímica de la glucosa sobre Pt en disolución tampón fosfato (PBS, *Phosphate Buffer Solution*) a pH neutro se discute en base a tres rangos de potencial en el voltograma cíclico obtenido

(Figura 1.13), donde la etapa previa es la deshidrogenación en el C₁ de la β-glucosa [255,257–259].

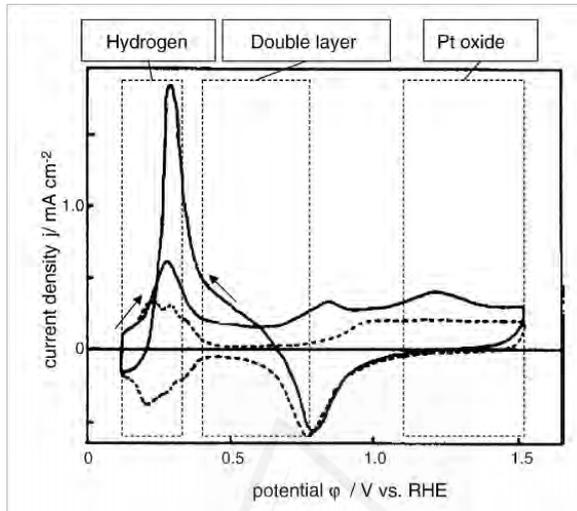


Figura 1.13. Voltagrama cíclico en ausencia (línea punteada) y en presencia (línea sólida) de 0.1 M de glucosa en PBS a pH 7.5 mostrando las tres regiones de potencial donde la glucosa es electroquímicamente oxidada en un electrodo de Pt (Fuente: Ref. [250]).

El primer pico correspondiente a esta oxidación se localiza en el rango de potenciales de la adsorción electroquímica del hidrógeno ($< 0.3\text{ V}$ vs el electrodo reversible de hidrógeno). La oxidación de la glucosa en esta región se relaciona con la adsorción de los átomos de hidrógeno, donde el centro activo de la reacción es el grupo hemiacetal de la glucosa. El segundo pico aparece en el rango de potenciales comprendido entre 0.3 y 0.6 V , región denominada como “región de la doble capa”. El último pico aparece a potenciales superiores a 0.7 V (región de la adsorción de oxígeno), donde el Pt se encuentra prácticamente recubierto de especies oxigenadas ($\text{PtO}_{\text{X ads}}$). En el capítulo 6 se incluye una revisión bibliográfica sobre los materiales carbonosos empleados tanto en el desarrollo de sensores como de biosensores de glucosa.

4. Bibliografía

- [1] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*, *Sensors*, 8 (2008) 1400–1458.
- [2] Serge Cosnier, *Electrochemical Biosensors*, Pan Stanford Series on the High-Tech of Biotechnology, Volume 3, 2015.
- [3] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical sensors: definitions and classification, *Pure Appl. Chem.*, 63 (2009) 1247–1250.
- [4] K. Cammann, B. Ross, A. Katerkamp, J. Reinbold, B. Grundig, R. Renneberg, *Chemical and biochemical sensors*, *Ullmanns Encycl. Ind. Chem.*, (2012) 109–221.
- [5] Y. Li, J. Xu, C. Sun, Chemical sensors and biosensors for the detection of melamine, *RSC Adv.*, 5 (2014) 1125–1147.
- [6] P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, J. Riu, F.X. Rius, Electrochemical sensing based on carbon nanotubes, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 939–953.
- [7] Joseph Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd Edition, Wiley.
- [8] C.R. Lowe, *Biosensors*, *Trends Biotechnol.*, 2 (1984) 59–65.
- [9] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 441–456.
- [10] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 121–131.
- [11] S.V. Dzyadevych, V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Amperometric enzyme biosensors: past, present and future, *IRBM.*, 29 (2008) 171–180.
- [12] G. Sánchez-Obrero, M. Cano, J.L. Ávila, M. Mayén, M.L. Mena, J.M. Pingarrón, R. Rodríguez-Amaro, A gold nanoparticle-modified PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination, *J. Electroanal. Chem.*, 634 (2009) 59–63.
- [13] H. Wu, J. Wang, X. Kang, C. Wang, D. Wang, J. Liu, I.A. Aksay, Y. Lin, Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film, *Talanta*, 80 (2009) 403–406.
- [14] N. German, A. Ramanaviciene, J. Voronovic, A. Ramanavicius, Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase

- and colloidal gold nanoparticles, *Microchim. Acta.*, 168 (2010) 221–229.
- [15] L. Yang, Y. Li, AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 1407–1416.
- [16] Y. Li, C.-H. Hsieh, C.-W. Lai, Y.-F. Chang, H.-Y. Chan, C.-F. Tsai, J.A. Ho, L. Wu, Tyramine detection using PEDOT:PSS/AuNPs/1-methyl-4-mercaptopyridine modified screen-printed carbon electrode with molecularly imprinted polymer solid phase extraction, *Biosens. Bioelectron.*, 87 (2017) 142–149.
- [17] M. Velmurugan, B. Thirumalraj, S.-M. Chen, F.M.A. Al-Hemaid, M. Ajmal Ali, M.S. Elshikh, Development of electrochemical sensor for the determination of palladium ions (Pd^{2+}) using flexible screen printed unmodified carbon electrode, *J. Colloid Interface Sci.*, 485 (2017) 123–128.
- [18] L. López-López, R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Disposable electrochemical aptasensor for gluten determination in food, *Sens. Actuators B Chem.*, 241 (2017) 522–527.
- [19] M. Moreno-Guzmán, L. García-Carmona, Á. Molinero-Fernández, F. Cava, M.Á. López Gil, A. Escarpa, Bi-enzymatic biosensor for on-site, fast and reliable electrochemical detection of relevant D-amino acids in bacterial samples, *Sens. Actuators B Chem.*, 242 (2017) 95–101.
- [20] L.M. Ochiai, D. Agustini, L.C.S. Figueiredo-Filho, C.E. Banks, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, Electroanalytical thread-device for estriol determination using screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes, *Sens. Actuators B Chem.*, 241 (2017) 978–984.
- [21] Y. Lim, B. Lee, J. Heo, H. Shin, Gold nanoparticle-carbon nanowire hybrid interdigitated array nanoelectrodes for enhancing electrochemical signal amplification, 2013 Transducers Eurosensors XXVII 17th Int. Conf. Solid-State Sens. Actuators Microsyst., (2013) 290–292.
- [22] D. Sharma, Y. Lim, Y. Lee, H. Shin, Glucose sensor based on redox-cycling between selectively modified and unmodified combs of carbon interdigitated array nanoelectrodes, *Anal. Chim. Acta*, 889 (2015) 194–202.

- [23] J.I. Heo, D.S. Shim, G.T. Teixidor, S. Oh, M.J. Madou, H. Shin, Carbon interdigitated array nanoelectrodes for electrochemical applications, *J. Electrochem. Soc.*, 158 (2011) J76–J80.
- [24] P. D’Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 334 (2003) 41–69.
- [25] Michio Inagaki, Feiyu Kang, *Materials Science and Engineering of Carbon: Fundamentals*, Second Edition, Tsinghua University Oress Limited.
- [26] A. Krueger, *Carbon nanotubes*, *Carbon Mater. Nanotechnol.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010: pp. 123–281.
- [27] M. Wissler, Graphite and carbon powders for electrochemical applications, *J. Power Sources*. 156 (2006) 142–150.
- [28] IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd edition, 1977.
- [29] Peter Atkins, Tina Overton, Jonathan Rourke, Mark Weller, Fraser Armstrong, Michael Hagerman, Shriver & Atkins *Inorganic Chemistry*, 5th edition, Oxford University Press.
- [30] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science*, 306 (2004) 666–669.
- [31] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354 (1991) 56–58.
- [32] M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner, Honeycomb carbon: a review of graphene, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 132–145.
- [33] K.R. Ratinac, W. Yang, J.J. Gooding, P. Thordarson, F. Braet, Graphene and related materials in electrochemical sensing, *Electroanalysis*, 23 (2011) 803–826.
- [34] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J.W. Suk, J.R. Potts, R.S. Ruoff, Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications, *Adv. Mater.*, 22 (2010) 3906–3924.
- [35] R.R. Nair, P. Blake, A.N. Grigorenko, K.S. Novoselov, T.J. Booth, T. Stauber, N.M.R. Peres, A.K. Geim, Fine structure constant defines visual transparency of graphene, *Science*, 320 (2008) 1308–1308.
- [36] P. Blake, P.D. Brimicombe, R.R. Nair, T.J. Booth, D. Jiang, F. Schedin, L.A. Ponomarenko, S.V. Morozov, H.F. Gleeson, E.W. Hill, A.K. Geim, K.S. Novoselov, Graphene-based liquid crystal device, *Nano Lett.*, 8 (2008) 1704–1708.
- [37] S. Bae, H. Kim, Y. Lee, X. Xu, J.-S. Park, Y. Zheng, J. Balakrishnan, T. Lei, H. Ri Kim, Y.I. Song, Y.-J. Kim, K.S. Kim, B. Özyilmaz, J.-H. Ahn, B.H.

- Hong, S. Iijima, Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 574–578.
- [38] C. Lee, X. Wei, J.W. Kysar, J. Hone, Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, *Science*, 321 (2008) 385–388.
- [39] A.A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C.N. Lau, Superior thermal conductivity of single-layer graphene, *Nano Lett.*, 8 (2008) 902–907.
- [40] M.M. Sadeghi, M.T. Pettes, L. Shi, Thermal transport in graphene, *Solid State Commun.* 152 (2012) 1321–1330.
- [41] J.H. Seol, I. Jo, A.L. Moore, L. Lindsay, Z.H. Aitken, M.T. Pettes, X. Li, Z. Yao, R. Huang, D. Broido, N. Mingo, R.S. Ruoff, L. Shi, Two-dimensional phonon transport in supported graphene, *Science*, 328 (2010) 213–216.
- [42] C.E. Banks, T.J. Davies, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites, *Chem. Commun.*, (2005) 829–841.
- [43] M. Pumera, Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage, *Chem. Rec.*, 9 (2009) 211–223.
- [44] K.I. Bolotin, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H.L. Stormer, Ultrahigh electron mobility in suspended graphene, *Solid State Commun.*, 146 (2008) 351–355.
- [45] D.A.C. Brownson, C.E. Banks, Graphene electrochemistry: an overview of potential applications, *Analyst*, 135 (2010) 2768–2778.
- [46] M. Pumera, A. Ambrosi, A. Bonanni, E.L.K. Chng, H.L. Poh, Graphene for electrochemical sensing and biosensing, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 954–965.
- [47] A. Abellán-Llobregat, M. Ayán-Varela, L. Vidal, J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Canals, E. Morallón, Flavin mononucleotide-exfoliated graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid, *J. Electroanal. Chem.*, 783 (2016) 41–48.
- [48] C. Botas, P. Álvarez, P. Blanco, M. Granda, C. Blanco, R. Santamaría, L.J. Romasanta, R. Verdejo, M.A. López-Manchado, R. Menéndez, Graphene materials with different structures prepared from the same graphite by the Hummers and Brodie methods, *Carbon*, 65 (2013) 156–164.

- [49] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 1339–1339.
- [50] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS Nano.*, 4 (2010) 4806–4814.
- [51] K.P. Loh, Q. Bao, G. Eda, M. Chhowalla, Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications, *Nat. Chem.*, 2 (2010) 1015–1024.
- [52] W. Gao, L.B. Alemany, L. Ci, P.M. Ajayan, New insights into the structure and reduction of graphite oxide, *Nat. Chem.*, 1 (2009) 403–408.
- [53] A. Hunt, D.A. Dikin, E.Z. Kurmaev, T.D. Boyko, P. Bazylewski, G.S. Chang, A. Moewes, Epoxide speciation and functional group distribution in graphene oxide paper-like materials, *Adv. Funct. Mater.*, 22 (2012) 3950–3957.
- [54] J. Lee, J. Kim, S. Kim, D.-H. Min, Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 105, Part B (2016) 275–287.
- [55] Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li, Y. Lin, Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 29 (2011) 205–212.
- [56] Y. Liu, X. Dong, P. Chen, Biological and chemical sensors based on graphene materials, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 2283–2307.
- [57] C. Chung, Y.-K. Kim, D. Shin, S.-R. Ryoo, B.H. Hong, D.-H. Min, Biomedical applications of graphene and graphene oxide, *Acc. Chem. Res.*, 46 (2013) 2211–2224.
- [58] T.W. Ebbesen, P.M. Ajayan, Large-scale synthesis of carbon nanotubes, *Nature*, 358 (1992) 220–222.
- [59] S. Iijima, T. Ichihashi, Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*, 363 (1993) 603–605.
- [60] A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, M. Abasi, Y. Hanifehpour, S.W. Joo, Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Res. Lett.*, 9 (2014) 393.
- [61] Wildgoose, Gregory G., Banks, Craig E., Leventis, Henry C., Comptin, Richard G., Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis, *Microchim. Acta*, 2006. 152 187–214.

- [62] A. Leonhardt, M. Ritschel, K. Bartsch, A. Graft, C. Täschner, J. Fink, Chemical vapour deposition - a promising method for production of different kinds of carbon nanotubes, *Journal De Physique. IV*, (2001) 3445-3451.
- [63] Y.Y. Wang, G.Y. Tang, F.A.M. Koeck, B. Brown, J.M. Garguilo, R.J. Nemanich, Experimental studies of the formation process and morphologies of carbon nanotubes with bamboo mode structures, *Diam. Relat. Mater.*, 13 (2004) 1287–1291.
- [64] K.D. Ausman, R. Piner, O. Lourie, R.S. Ruoff, M. Korobov, Organic solvent dispersions of single-walled carbon nanotubes: toward solutions of pristine nanotubes, *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 8911–8915.
- [65] C. González-Gaitán, R. Ruiz-Rosas, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Functionalization of carbon nanotubes using aminobenzene acids and electrochemical methods. Electroactivity for the oxygen reduction reaction, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 11242–11253.
- [66] D.H. Lee, W.J. Lee, S.O. Kim, Highly efficient vertical growth of wall-number-selected, N-doped carbon nanotube arrays, *Nano Lett.*, 9 (2009) 1427–1432.
- [67] D. Wei, C. Kvarnström, T. Lindfors, A. Ivaska, Electrochemical functionalization of single walled carbon nanotubes with polyaniline in ionic liquids, *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 206–210.
- [68] S. Maldonado, S. Morin, K.J. Stevenson, Structure, composition, and chemical reactivity of carbon nanotubes by selective nitrogen doping, *Carbon*, 44 (2006) 1429–1437.
- [69] K. Gong, Y. Yan, M. Zhang, L. Su, S. Xiong, L. Mao, Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: a review, *Anal. Sci.*, 21 (2005) 1383–1393.
- [70] F. Béguin, E. Frackowiak, *Carbons for electrochemical energy storage and conversion systems*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2009.
- [71] J. Abrahamson, The surface energies of graphite, *Carbon*, 11 (1973) 337–362.
- [72] L.R. Radovic, I.F. Silva, J.I. Ume, J.A. Menéndez, C.A.L.Y. Leon, A.W. Scaroni, An experimental and theoretical study of the adsorption of aromatics possessing electron-withdrawing and electron-donating functional groups by chemically modified activated carbons, *Carbon*, 35 (1997) 1339–1348.

- [73] C.A. Leon y Leon, J.M. Solar, V. Calemma, L.R. Radovic, Evidence for the protonation of basal plane sites on carbon, *Carbon*, 30 (1992) 797–811.
- [74] Chapter 9, in: *Chem. Funct. Carbon Mater. Chem. Appl.*, CRC Press, 2016.
- [75] T.J. Simmons, J. Bult, D.P. Hashim, R.J. Linhardt, P.M. Ajayan, Noncovalent functionalization as an alternative to oxidative acid treatment of single wall carbon nanotubes with applications for polymer composites, *ACS Nano.*, 3 (2009) 865–870.
- [76] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6156–6214.
- [77] J. Chen, H. Liu, W.A. Weimer, M.D. Halls, D.H. Waldeck, G.C. Walker, Noncovalent engineering of carbon nanotube surfaces by rigid, functional conjugated polymers, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 9034–9035.
- [78] M. Shim, N.W. Shi Kam, R.J. Chen, Y. Li, H. Dai, Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition, *Nano Lett.*, 2 (2002) 285–288.
- [79] J.H. Chen, Z.P. Huang, D.Z. Wang, S.X. Yang, W.Z. Li, J.G. Wen, Z.F. Ren, Electrochemical synthesis of polypyrrole films over each of well-aligned carbon nanotubes, *Synth. Met.*, 125 (2001) 289–294.
- [80] H. Bai, Y. Xu, L. Zhao, C. Li, G. Shi, Non-covalent functionalization of graphene sheets by sulfonated polyaniline, *Chem. Commun.*, (2009) 1667–1669.
- [81] T. Kuila, S. Bose, A.K. Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee, Chemical functionalization of graphene and its applications, *Prog. Mater. Sci.*, 57 (2012) 1061–1105.
- [82] H. Huang, W. Zhang, M. Li, Y. Gan, J. Chen, Y. Kuang, Carbon nanotubes as a secondary support of a catalyst layer in a gas diffusion electrode for metal air batteries, *J. Colloid Interface Sci.*, 284 (2005) 593–599.
- [83] M. Carmo, V.A. Paganin, J.M. Rosolen, E.R. Gonzalez, Alternative supports for the preparation of catalysts for low-temperature fuel cells: the use of carbon nanotubes, *J. Power Sources*, 142 (2005) 169–176.
- [84] J.-P. Tessonier, L. Pesant, G. Ehret, M.J. Ledoux, C. Pham-Huu, Pd nanoparticles introduced inside multi-walled carbon nanotubes for

- selective hydrogenation of cinnamaldehyde into hydrocinnamaldehyde, *Appl. Catal. Gen.*, 288 (2005) 203–210.
- [85] G.G. Wildgoose, C.E. Banks, R.G. Compton, Metal nanoparticles and related materials supported on carbon nanotubes: methods and applications, *Small*, 2 (2006) 182–193.
- [86] B.C. Satishkumar, E.M. Vogl, A. Govindaraj, C.N.R. Rao, The decoration of carbon nanotubes by metal nanoparticles, *J. Phys. Appl. Phys.*, 29 (1996) 3173.
- [87] Y. Wang, Z. Iqbal, S.V. Malhotra, Functionalization of carbon nanotubes with amines and enzymes, *Chem. Phys. Lett.*, 402 (2005) 96–101.
- [88] A. Hirsch, J.M. Englert, F. Hauke, Wet chemical functionalization of graphene, *Acc. Chem. Res.*, 46 (2013) 87–96.
- [89] Z. Yang, Z. Yao, G. Li, G. Fang, H. Nie, Z. Liu, X. Zhou, X. Chen, S. Huang, Sulfur-doped graphene as an efficient metal-free cathode catalyst for oxygen reduction, *ACS Nano.*, 6 (2012) 205–211.
- [90] W. Shen, W. Fan, Nitrogen-containing porous carbons: synthesis and application, *J. Mater. Chem. A*, 1 (2012) 999–1013.
- [91] J.B. Donnet, The chemical reactivity of carbons, *Carbon*, 6 (1968) 161–176.
- [92] E. Fitzer, R. Weiss, Effect of surface treatment and sizing of c-fibres on the mechanical properties of cfr thermosetting and thermoplastic polymers, *Carbon*, 25 (1987) 455–467.
- [93] C. Moreno-Castilla, M.V. López-Ramón, F. Carrasco-Marín, Changes in surface chemistry of activated carbons by wet oxidation, *Carbon*, 38 (2000) 1995–2001.
- [94] C.M. Elliott, R.W. Murray, Chemically modified carbon electrodes, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1247–1254.
- [95] J.A. Osborn, R.M. Ianniello, H.J. Wieck, T.F. Decker, S.L. Gordan, A.M. Yacynych, Use of chemically modified activated carbon as a support for immobilized enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, 24 (1982) 1653–1669.
- [96] X. Peng, S.S. Wong, Functional covalent chemistry of carbon nanotube surfaces, *Adv. Mater.*, 21 (2009) 625–642.
- [97] J.L. Bahr, J.M. Tour, Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes, *J. Mater. Chem.*, 12 (2002) 1952–1958.
- [98] S. Banerjee, S.S. Wong, Functionalization of carbon nanotubes with a metal-containing molecular complex, *Nano Lett.*, 2 (2002) 49–53.

- [99] D.W. Boukhvalov, M.I. Katsnelson, Chemical functionalization of graphene with defects, *Nano Lett.*, 8 (2008) 4373–4379.
- [100] J.M. Englert, C. Dotzer, G. Yang, M. Schmid, C. Papp, J.M. Gottfried, H.-P. Steinrück, E. Spiecker, F. Hauke, A. Hirsch, Covalent bulk functionalization of graphene, *Nat. Chem.*, 3 (2011) 279–286.
- [101] H.J. Salavagione, G. Martínez, G. Ellis, Recent advances in the covalent modification of graphene with polymers, *Macromol. Rapid Commun.*, 32 (2011) 1771–1789.
- [102] V.S. Bagotsky, *Fundamentals of Electrochemistry*, John Wiley and Sons, 2006.
- [103] R. Berenguer, J.P. Marco-Lozar, C. Quijada, D. Cazorla-Amorós, E. Morallón, A comparison between oxidation of activated carbon by electrochemical and chemical treatments, *Carbon*, 50 (2012) 1123–1134.
- [104] D. Pletcher, R. Greff, R. Peat, L.M. Peter, J. Robinson, *Instrumental methods in electrochemistry*, 1st edition, Woodhead Publishing Limited, Oxford.
- [105] Allen. J. Bard, Larry R. Faulker, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, Second edition.
- [106] D. Salinas-Torres, J.M. Sieben, D. Lozano-Castelló, D. Cazorla-Amorós, E. Morallón, Asymmetric hybrid capacitors based on activated carbon and activated carbon fibre–PANI electrodes, *Electrochimica Acta*, 89 (2013) 326–333.
- [107] A. Chen, P. Holt-Hindle, Platinum-based nanostructured materials: synthesis, properties, and applications, *Chem. Rev.*, 110 (2010) 3767–3804.
- [108] D. Guo, H. Li, Electrochemical synthesis of Pd nanoparticles on functional MWNT surfaces, *Electrochem. Commun.*, 6 (2004) 999–1003.
- [109] D.-J. Guo, H.-L. Li, High dispersion and electrocatalytic properties of palladium nanoparticles on single-walled carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.*, 286 (2005) 274–279.
- [110] C. Paoletti, A. Cemmi, L. Giorgi, R. Giorgi, L. Pilloni, E. Serra, M. Pasquali, Electro-deposition on carbon black and carbon nanotubes of Pt nanostructured catalysts for methanol oxidation, *J. Power Sources*, 183 (2008) 84–91.
- [111] Y.-C. Tsai, Y.-H. Hong, Electrochemical deposition of platinum nanoparticles in multiwalled carbon nanotube–nafion composite for

- methanol electrooxidation, *J. Solid State Electrochem.*, 12 (2008) 1293–1299.
- [112] B.M. Quinn, C. Dekker, S.G. Lemay, Electrodeposition of noble metal nanoparticles on carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 6146–6147.
- [113] T.M. Day, P.R. Unwin, N.R. Wilson, J.V. Macpherson, Electrochemical templating of metal nanoparticles and nanowires on single-walled carbon nanotube networks, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 10639–10647.
- [114] Z. He, J. Chen, D. Liu, H. Zhou, Y. Kuang, Electrodeposition of Pt–Ru nanoparticles on carbon nanotubes and their electrocatalytic properties for methanol electrooxidation, *Diam. Relat. Mater.*, 13 (2004) 1764–1770.
- [115] M.-C. Tsai, T.-K. Yeh, C.-H. Tsai, Electrodeposition of platinum-ruthenium nanoparticles on carbon nanotubes directly grown on carbon cloths for methanol oxidation, *Mater. Chem. Phys.*, 109 (2008) 422–428.
- [116] D. Bélanger, J. Pinson, Electrografting: a powerful method for surface modification, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 3995–4048.
- [117] K. Kinoshita, J. Bett, Electrochemical oxidation of carbon black in concentrated phosphoric acid at 135°C, *Carbon*, 11 (1973) 237–247.
- [118] K. Kinoshita, J.A.S. Bett, Potentiodynamic analysis of surface oxides on carbon blacks, *Carbon*, 11 (1973) 403–411.
- [119] L.N. Lewis, Chemical catalysis by colloids and clusters, *Chem. Rev.*, 93 (1993) 2693–2730.
- [120] P. Mulvaney, Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles, *Langmuir*, 12 (1996) 788–800.
- [121] M.M. Alvarez, J.T. Houry, T.G. Schaaff, M.N. Shafiqullin, I. Vezmar, R.L. Whetten, Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 3706–3712.
- [122] Ali Eftekhari, *Nanostructured materials in electrochemistry*, Wiley-VCH.
- [123] J. Wang, Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 130 (2005) 421–426.
- [124] J. Wang, Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Electroanalysis*, 17 (2005) 7–14.

- [125] M. Feng, H. Han, J. Zhang, H. Tachikawa, CHAPTER 15 - Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, in: *Electrochem. Sens. Biosens. Their Biomed. Appl.*, Academic Press, San Diego, 2008: p. 459–VIII.
- [126] T. You, O. Niwa, M. Tomita, S. Hirono, Characterization of Platinum Nanoparticle-Embedded Carbon Film Electrode and Its Detection of Hydrogen Peroxide, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2080–2085.
- [127] M. Yang, Y. Yang, Y. Liu, G. Shen, R. Yu, Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1125–1131.
- [128] S. Hrapovic, Y. Liu, K.B. Male, J.H.T. Luong, Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 1083–1088.
- [129] J.X. Wilson, Regulation of vitamin c transport, *Annu. Rev. Nutr.*, 25 (2005) 105–125.
- [130] J. Du, J.J. Cullen, G.R. Buettner, Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, 1826 (2012) 443–457.
- [131] V. Valpuesta, M.A. Botella, Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant, *Trends Plant Sci.*, 9 (2004) 573–577.
- [132] R.F. Cathcart, A unique function for ascorbate, *Med. Hypotheses*, 35 (1991) 32–37.
- [133] H. Sies, W. Stahl, A.R. Sundquist, Antioxidant Functions of Vitamins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 669 (1992) 7–20.
- [134] S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.*, 22 (2003) 18–35.
- [135] S. Englund, S. Seifter, The Biochemical functions of ascorbic acid, *Annu. Rev. Nutr.*, 6 (1986) 365–406.
- [136] A. Ozer, R.K. Bruick, Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one?, *Nat. Chem. Biol.*, 3 (2007) 144–153.
- [137] J.C. Geesin, D. Darr, R. Kaufman, S. Murad, S.R. Pinnell, Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, 90 (1988) 420–424.
- [138] A.A. Fowler, A.A. Syed, S. Knowlson, R. Sculthorpe, D. Farthing, C. DeWilde, C.A. Farthing, T.L. Larus, E. Martin, D.F. Brophy, S. Gupta,

- Medical Respiratory Intensive Care Unit Nursing, B.J. Fisher, R. Natarajan, Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis, *J. Transl. Med.*, 12 (2014) 32.
- [139] F.T. Thorpe, Ascorbic acid in urine, *Br. Med. J.*, 1 (1938) 542.
- [140] C.J. Harvey, R.F. LeBouf, A.B. Stefaniak, Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use, *Toxicol. In Vitro*, 24 (2010) 1790–1796.
- [141] D. Hornig, Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258 (1975) 103–118.
- [142] A. Aditi, D.Y. Graham, Vitamin C, gastritis, and gastric disease: a historical review and update, *Dig. Dis. Sci.*, 57 (2012).
- [143] A. Cherubini, C. Ruggiero, M.C. Polidori, P. Mecocci, Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radic. Biol. Med.*, 39 (2005) 841–852.
- [144] O. Traxer, B. Huet, J. Poindexter, C.Y.C. Pak, M.S. Pearle, Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors, *J. Urol.*, 170 (2003) 397–401.
- [145] P. b. Nunn, Oxalic acid in biology and medicine, *FEBS Lett.*, 101 (1979) 421–421.
- [146] Q. Chen, M.G. Espey, M.C. Krishna, J.B. Mitchell, C.P. Corpe, G.R. Buettner, E. Shacter, M. Levine, Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005) 13604–13609.
- [147] Q. Chen, M.G. Espey, A.Y. Sun, J.-H. Lee, M.C. Krishna, E. Shacter, P.L. Choyke, C. Pooput, K.L. Kirk, G.R. Buettner, M. Levine, Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 8749–8754.
- [148] Q. Chen, M.G. Espey, A.Y. Sun, C. Pooput, K.L. Kirk, M.C. Krishna, D.B. Khosh, J. Drisko, M. Levine, Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105 (2008) 11105–11109.
- [149] J. Du, S.M. Martin, M. Levine, B.A. Wagner, G.R. Buettner, S. Wang, A.F. Taghiyev, C. Du, C.M. Knudson, J.J. Cullen, Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, 16 (2010) 509–520.
- [150] S.S. Nielsen, Chapter 7, in: *Food Anal. Lab. Man.*, 2nd edition, Springer Science + Business Media, 2010: p. 55.

- [151] G.S. Deshmukh, M.G. Bapat, Determination of ascorbic acid by potassium iodate, *Fresenius Z. Für Anal. Chem.*, 145 (1955) 254–256.
- [152] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Cengage Learning, Inc, California, 2007.
- [153] E.J. Oliveira, D.G. Watson, Chromatographic techniques for the determination of putative dietary anticancer compounds in biological fluids, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, 764 (2001) 3–25.
- [154] H. Iwase, I. Ono, Determination of ascorbic acid in food by column liquid chromatography with electrochemical detection using eluent for pre-run sample stabilization, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 361–364.
- [155] M.A. Kall, C. Andersen, Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, 730 (1999) 101–111.
- [156] H. Iwase, Use of nucleic acids in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 327–330.
- [157] A. Rizzolo, A. Brambilla, S. Valsecchi, P. Eccher-Zerbini, Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue, *Food Chem.*, 77 (2002) 257–262.
- [158] S.P. Arya, M. Mahajan, P. Jain, Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 1–14.
- [159] S. Vermeir, M.L.A.T.M. Hertog, A. Schenk, K. Beullens, B.M. Nicolaï, J. Lammertyn, Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast l-ascorbic acid quantification in fruit and vegetables, *Anal. Chim. Acta*, 618 (2008) 94–101.
- [160] J.A. Nóbrega, G.S. Lopes, Flow-injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical products with the Prussian Blue reaction, *Talanta*, 43 (1996) 971–976.
- [161] T. Lenarczuk, S. Głąb, R. Koncki, Application of Prussian blue-based optical sensor in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26 (2001) 163–169.
- [162] R. Koncki, O.S. Wolfbeis, Optical chemical sensing based on thin films of Prussian Blue, *Sens. Actuators B Chem.*, 51 (1998) 355–358.
- [163] A.F. Danet, V. David, M. Oancea, Flow injection analysis device with hydrodynamic injection. Vitamin C determination, *Rev Chim Buchar.*, 45 (1994) 1000.

- [164] A.F. Dănet, M. Badea, H.Y. Aboul-Enein, Flow injection system with chemiluminometric detection for enzymatic determination of ascorbic acid, *Luminescence*, 15 (2000) 305–309.
- [165] A.M. Pisoschi, A. Pop, A.I. Serban, C. Fafaneata, Electrochemical methods for ascorbic acid determination, *Electrochimica Acta*, 121 (2014) 443–460.
- [166] M. Zhang, K. Liu, L. Xiang, Y. Lin, L. Su, L. Mao, Carbon nanotube-modified carbon fiber microelectrodes for in vivo voltammetric measurement of ascorbic acid in rat brain, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6559–6565.
- [167] J.J. Ruiz, A. Aldaz, M. Dominguez, Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium, *Can. J. Chem.*, 55 (1977) 2799–2806.
- [168] J.J. Ruiz, A. Aldaz, M. Dominguez, Mechanism of L-ascorbic acid oxidation on a mercury electrode. II. Basic medium, *Can. J. Chem.*, 56 (1978) 1533–1537.
- [169] F. Prieto, B.A. Coles, R.G. Compton, Mechanistic determination using arrays of variable-sized channel microband electrodes: the oxidation of ascorbic acid in aqueous solution, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 7442–7447.
- [170] H. Borsook, H.W. Davenport, C.E.P. Jeffreys, R.C. Warner, The oxidation of ascorbic acid and its reduction in vitro and in vivo, *J Biol Chem.*, 117 (1937) 237–279.
- [171] C.R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka, Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine, *J. Electroanal. Chem.*, 543 (2003) 127–133.
- [172] C.R. Raj, T. Ohsaka, Electroanalysis of ascorbate and dopamine at a gold electrode modified with a positively charged self-assembled monolayer, *J. Electroanal. Chem.*, 496 (2001) 44–49.
- [173] C.R. Raj, K. Tokuda, T. Ohsaka, Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate, *Bioelectrochemistry*, 53 (2001) 183–191.
- [174] M.A. Climent, A. Rodes, M.J. Valls, J.M. Pérez, J.M. Feliu, A. Aldaz, Voltammetric and subtractively normalized interfacial FTIR study of the adsorption and oxidation of L(+)-ascorbic acid on Pt electrodes in acid medium: effect of Bi adatoms, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 90* (1994) 609–615.

- [175] J. Yan, S. Liu, Z. Zhang, G. He, P. Zhou, H. Liang, L. Tian, X. Zhou, H. Jiang, Simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on graphene anchored with Pd–Pt nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 111 (2013) 392–397.
- [176] H. Ernst, M. Knoll, Electrochemical characterisation of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode, *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 129–134.
- [177] K.B. Kokoh, F. Hahn, A. Métayer, C. Lamy, FTIR spectroelectrochemical investigation of the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid at platinum electrodes in acid medium, *Electrochimica Acta*, 47 (2002) 3965–3969. ,
- [178] P. Karabinas, D. Jannakoudakis, Kinetic parameters and mechanism of the electrochemical oxidation of L-ascorbic acid on platinum electrodes in acid solutions, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 160 (1984) 159–167.
- [179] Y.-C. Weng, Y.-G. Lee, Y.-L. Hsiao, C.-Y. Lin, A highly sensitive ascorbic acid sensor using a Ni–Pt electrode, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 9937–9945.
- [180] X. Wang, P. Wu, X. Hou, Y. Lv, An ascorbic acid sensor based on protein-modified Au nanoclusters, *Analyst*, 138 (2012) 229–233.
- [181] R.A.A. Muñoz, R.C. Matos, L. Angnes, Gold electrodes from compact discs modified with platinum for amperometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical formulations, *Talanta*, 55 (2001) 855–860.
- [182] J. Huang, Y. Liu, H. Hou, T. You, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 632–637.
- [183] S. Qi, B. Zhao, H. Tang, X. Jiang, Determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by a novel electrochemical sensor based on pristine graphene, *Electrochimica Acta*, 161 (2015) 395–402.
- [184] L. Zhang, X. Jiang, Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine, *J. Electroanal. Chem.*, 583 (2005) 292–299.
- [185] M. Choukairi, D. Bouchta, L. Bounab, M. Ben atyah, R. Elkhamlichi, F. Chaouket, I. Raissouni, I.N. Rodriguez, Electrochemical detection of

- uric acid and ascorbic acid: application in serum, *J. Electroanal. Chem.*, 758 (2015) 117–124.
- [186] S. Yan, X. Li, Y. Xiong, M. Wang, L. Yang, X. Liu, X. Li, L.A.M. Alshahrani, P. Liu, C. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with the nickel(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex and single-walled carbon nanotubes, *Microchim. Acta*, (2016) 1–8.
- [187] J. Jiang, X. Du, Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites, *Nanoscale*, 6 (2014) 11303–11309.
- [188] H. Imran, P.N. Manikandan, V. Dharuman, Facile and green synthesis of graphene oxide by electrical exfoliation of pencil graphite and gold nanoparticle for non-enzymatic simultaneous sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *RSC Adv.*, 5 (2015) 63513–63520.
- [189] A. Joshi, W. Schuhmann, T. C. Nagaiah, Mesoporous nitrogen containing carbon materials for the simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *Sens. Actuators B Chem.*, 230 (2016) 544–555.
- [190] Y.-T. Shieh, H.-F. Jiang, Graphene oxide-assisted dispersion of carbon nanotubes in sulfonated chitosan-modified electrode for selective detections of dopamine, uric acid, and ascorbic acid, *J. Electroanal. Chem.*, 736 (2015) 132–138.
- [191] W.S. Waring, D.J. Webb, S.R.J. Maxwell, Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease, *QJM.*, 93 (2000) 707–713.
- [192] T.R. Merriman, H.K. Choi, N. Dalbeth, The genetic basis of gout, *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, 40 (2014) 279–290.
- [193] A. So, B. Thorens, Uric acid transport and disease, *J. Clin. Invest.*, 120 (2010) 1791–1799.
- [194] D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, P.S. Sharma, B.B. Prasad, Electrochemical detection of uric acid in mixed and clinical samples: a review, *Electroanalysis*, 23 (2011) 305–320.
- [195] H.K. Choi, K. Atkinson, E.W. Karlson, G. Curhan, Obesity, Weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men: the health professionals follow-up study, *Arch. Intern. Med.*, 165 (2005) 742–748.
- [196] S. Takahashi, T. Yamamoto, Z. Tsutsumi, Y. Moriwaki, J. Yamakita, K. Higashino, Close correlation between visceral fat accumulation and

- uric acid metabolism in healthy men, *Metabolism*. 46 (1997) 1162–1165.
- [197] Q. Lv, X.-F. Meng, F.-F. He, S. Chen, H. Su, J. Xiong, P. Gao, X.-J. Tian, J.-S. Liu, Z.-H. Zhu, K. Huang, C. Zhang, High serum uric acid and increased risk of type 2 diabetes: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies, *PLOS ONE*, 8 (2013) e56864.
- [198] M. Mazzali, J. Hughes, Y.-G. Kim, J.A. Jefferson, D.-H. Kang, K.L. Gordon, H.Y. Lan, S. Kivlighn, R.J. Johnson, Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism, *Hypertension*, 38 (2001) 1101–1106.
- [199] R.J. Johnson, D.-H. Kang, D. Feig, S. Kivlighn, J. Kanellis, S. Watanabe, K.R. Tuttle, B. Rodriguez-Iturbe, J. Herrera-Acosta, M. Mazzali, Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?, *Hypertension*, 41 (2003) 1183–1190.
- [200] H. Huang, B. Huang, Y. Li, Y. Huang, J. Li, H. Yao, X. Jing, J. Chen, J. Wang, Uric acid and risk of heart failure: a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Heart Fail.*, 16 (2014) 15–24.
- [201] M. Alderman, K.J.V. Aiyer, Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan, *Curr. Med. Res. Opin.*, 20 (2004) 369–379.
- [202] G. Toncevic, B. Milicic, S. Toncevic, G. Samardzic, Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction, *Eur. J. Neurol.*, 9 (2002) 221–226.
- [203] W.H. Church, V.L. Ward, Uric acid is reduced in the substantia nigra in parkinson's disease: effect on dopamine oxidation, *Brain Res. Bull.*, 33 (1994) 419–425.
- [204] T.-S. Kim, C.-U. Pae, S.-J. Yoon, W.-Y. Jang, N.J. Lee, J.-J. Kim, S.-J. Lee, C. Lee, I.-H. Paik, C.-U. Lee, Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 21 (2006) 344–348.
- [205] C.M. Knapp, C.S. Constantinescu, J.H. Tan, R. McLean, G.R. Cherryman, I. Gottlob, Serum uric acid levels in optic neuritis, *Mult. Scler.*, 10 (2004) 278–280.
- [206] M.K. Kutzing, B.L. Firestein, Altered uric acid levels and disease states, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (2008) 1–7.
- [207] Kissinger, P.T., Pachla, L.A., Reynolds, LD., Wright, S., Analytical methods for measuring uric acid in biological samples and food products, 1987 *J Assoc Anal Chem* 70 P1.

- [208] K. Shibasaki, M. Kimura, R. Ikarashi, A. Yamaguchi, T. Watanabe, Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia, *Metabolomics*, 8 (2012) 484–491.
- [209] R. Gogia, S.P. Richer, R.C. Rose, Tear fluid content of electrochemically active components including water soluble antioxidants, *Curr. Eye Res.*, 17 (1998) 257–263.
- [210] M.B. Blanch, F.C. Koch, A New Method for the Determination of uric acid in blood, with uricase, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 443–454.
- [211] O. Folin, A.B. Macallum, A New Method for the (colorimetric) Determination of uric acid in urine, *J. Biol. Chem.*, 13 (1912) 363–369.
- [212] O.C. Ingebretsen, J. Borgen, M. Farstad, Uric acid determinations: reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection compared with kinetic and equilibrium adaptations of the uricase method., *Clin. Chem.*, 28 (1982) 496–498.
- [213] R. Sakuma, T. Nishina, M. Kitamura, Deproteinizing methods evaluated for determination of uric acid in serum by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection, *Clin. Chem.*, 33 (1987) 1427–1430.
- [214] C.K. Lim, D.E. Pryde, A.M. Lawson, Specific method for determining uric acid in serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 149 (1978) 711–720.
- [215] G.T.B. Sanders, A.J. Pasman, F.J. Hoek, Determination of uric acid with uricase and peroxidase, *Clin. Chim. Acta*, 101 (1980) 299–303.
- [216] D.W. Moss, Methodological principles in the enzymatic determination of substrates illustrated by the measurement of uric acid, *Clin. Chim. Acta*, 105 (1980) 351–360.
- [217] Y. Zhao, X. Yang, W. Lu, H. Liao, F. Liao, Uricase based methods for determination of uric acid in serum, *Microchim. Acta*, 164 (2008) 1–6.
- [218] P. Fossati, L. Prencipe, G. Berti, Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine., *Clin. Chem.*, 26 (1980) 227–231.
- [219] E.J. Lamb, C.P. Price, Use of azure-D2 for the measurement of uric acid in serum, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 33 (1995) 595–601.
- [220] M. Suzuki, M. Takayanagi, T. Yashiro, Use of the o-phenylenediamine fluorescence system in the enzymatic assay of serum uric acid, *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (1991) 2745–2747.

- [221] J. Galbán, Y. Andreu, M.J. Almenara, S. de Marcos, J.R. Castillo, Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase, *Talanta*, 54 (2001) 847–854.
- [222] R.N. Goyal, A. Brajter-Toth, G. Dryhurst, Further insights into the electrochemical oxidation of uric acid, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 131 (1982) 181–202.
- [223] S.A. John, Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrodes in acetate buffer solution, *J. Electroanal. Chem.*, 579 (2005) 249–256.
- [224] J. de Fátima Giarola, A. César Pereira, Development and application of a sensor based on carbonaceous materials and cobalt phthalocyanine composite for electrochemical determination of uric acid, *Electroanalysis*, 28 (2016) 1348–1355.
- [225] C. Retna Raj, T. Ohsaka, Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol, *J. Electroanal. Chem.*, 540 (2003) 69–77.
- [226] S. Ramakrishnan, K.R. Pradeep, A. Raghul, R. Senthilkumar, M. Rangarajan, N.K. Kothurkar, One-step synthesis of Pt-decorated graphene–carbon nanotubes for the electrochemical sensing of dopamine, uric acid and ascorbic acid, *Anal. Methods*, 7 (2015) 779–786.
- [227] L.V. da Silva, F. a. S. Silva, L.T. Kubota, C.B. Lopes, P.R. Lima, E.O. Costa, W.P. Júnior, M.O.F. Goulart, Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanillic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid, *J. Solid State Electrochem.*, 20 (2016) 2389–2393.
- [228] H. Zhang, J. Zhang, J. Zheng, Electrochemical behavior of modified electrodes with carbon nanotubes and nanofibers: application to the sensitive measurement of uric acid in the presence of ascorbic acid, *Measurement*, 59 (2015) 177–183.
- [229] S. Yan, X. Li, Y. Xiong, M. Wang, L. Yang, X. Liu, X. Li, L.A.M. Alshahrani, P. Liu, C. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with the nickel(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex and single-walled carbon nanotubes, *Microchim. Acta*, 183 (2016) 1401–1408.
- [230] N.G. Tsierkezos, S.H. Othman, U. Ritter, L. Hafermann, A. Knauer, J.M. Köhler, C. Downing, E.K. McCarthy, Electrochemical analysis of

- ascorbic acid, dopamine, and uric acid on nobel metal modified nitrogen-doped carbon nanotubes, *Sens. Actuators B Chem.*, 231 (2016) 218–229.
- [231] L. Yang, D. Liu, J. Huang, T. You, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, *Sens. Actuators B Chem.*, 193 (2014) 166–172.
- [232] S.A. Wring, J.P. Hart, Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. A review, *Analyst*, 117 (1992) 1215–1229.
- [233] Salvador Badui Dergal, *Química de los alimentos*, 4ª Edición, Pearson Addison Wesley.
- [234] A.L. Galant, R.C. Kaufman, J.D. Wilson, Glucose: detection and analysis, *Food Chem.* 188 (2015) 149–160.
- [235] F. Largeaud, K.B. Kokoh, B. Beden, C. Lamy, On the electrochemical reactivity of anomers: electrocatalytic oxidation of α - and β -d-glucose on platinum electrodes in acid and basic media, *J. Electroanal. Chem.*, 397 (1995) 261–269.
- [236] J. Wang, Electrochemical glucose biosensors, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 814–825.
- [237] F. Tehrani, B. Bavarian, Facile and scalable disposable sensor based on laser engraved graphene for electrochemical detection of glucose, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 27975.
- [238] H. Lee, T.K. Choi, Y.B. Lee, H.R. Cho, R. Ghaffari, L. Wang, H.J. Choi, T.D. Chung, N. Lu, T. Hyeon, S.H. Choi, D.-H. Kim, A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy, *Nat. Nanotechnol.*, 11 (2016) 566–572.
- [239] V.S. Siu, J. Feng, P.W. Flanigan, G.T.R. Palmore, D. Pacifici, A “plasmonic cuvette”: dye chemistry coupled to plasmonic interferometry for glucose sensing, *Nanophotonics*, 3 (2014) 125–140.
- [240] S. Ferri, K. Kojima, K. Sode, Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird’s eye view of glucose sensing enzymes, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 5 (2011) 1068–1076.
- [241] J. Raba, H.A. Mottola, Glucose oxidase as an analytical reagent, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 25 (1995) 1–42.

- [242] Gerd Wohlfahrt, Susanne Witt, Jörg Hendle, Dietmar Schomburg, Henryk M. Kalisz, Hans-Jürgen Hecht, 1.8 and 1.9 A resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes, *Acta Cryst.*, D55 969–977.
- [243] J. Wang, CHAPTER 3 - Electrochemical glucose biosensors, in: *Electrochem. Sens. Biosens. Their Biomed. Appl.*, Academic Press, San Diego, 2008: pp. 57–69.
- [244] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, L. Niu, Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 2378–2382.
- [245] C. Fu, W. Yang, X. Chen, D.G. Evans, Direct electrochemistry of glucose oxidase on a graphite nanosheet–Nafion composite film modified electrode, *Electrochem. Commun.*, 11 (2009) 997–1000.
- [246] A.E.G. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H.A.O. Hill, W.J. Aston, I.J. Higgins, E.V. Plotkin, L.D.L. Scott, A.P.F. Turner, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 667–671.
- [247] J.E. Frew, H.A.O. Hill, *Electrochemical biosensors*, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 933A–944A.
- [248] G.S. Wilson, Native glucose oxidase does not undergo direct electron transfer, *Biosens. Bioelectron.*, 82 (2016) vii–viii.
- [249] G. Wang, X. He, L. Wang, A. Gu, Y. Huang, B. Fang, B. Geng, X. Zhang, Non-enzymatic electrochemical sensing of glucose, *Microchim. Acta*, 180 (2012) 161–186.
- [250] S. Park, H. Boo, T.D. Chung, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors, *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 46–57.
- [251] D. Pletcher, *Electrocatalysis: present and future*, *J. Appl. Electrochem.*, 14 (1984) 403–415.
- [252] G. Kokkindis, J.M. Leger, C. Lamy, Structural effects in electrocatalysis, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 242 (1988) 221–242.
- [253] Y.B. Vassilyev, O.A. Khazova, N.N. Nikolaeva, Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: part I, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 196 (1985) 105–125.
- [254] Y.B. Vassilyev, O.A. Khazova, N.N. Nikolaeva, Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: part II, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 196 (1985) 127–144.

- [255] M.W. Hsiao, R.R. Adžić, E.B. Yeager, Electrochemical Oxidation of Glucose on Single Crystal and Polycrystalline Gold Surfaces in Phosphate Buffer, *J. Electrochem. Soc.*, 143 (1996) 759–767.
- [256] L.D. Burke, Premonolayer oxidation and its role in electrocatalysis, *Electrochimica Acta*, 39 (1994) 1841–1848.
- [257] M.F.L. de Mele, H.A. Videla, A.J. Arvía, 503—Comparative study of the electrochemical behaviour of glucose and other compounds of biological interest, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 141 (1982) 469–487.
- [258] M. Sakamoto, K. Takamura, Catalytic oxidation of biological components on platinum electrodes modified by adsorbed metals, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 9 (1982) 571–582.
- [259] S. Ernst, J. Heitbaum, C.H. Hamann, The electrooxidation of glucose in phosphate buffer solutions, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 100 (1979) 173–183.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CAPÍTULO 2

Técnicas y
métodos experimentales

1. Introducción

El objetivo de este capítulo es presentar los materiales y las técnicas empleadas para el desarrollo y caracterización de los materiales utilizados y de los sensores electroquímicos desarrollados en esta Tesis Doctoral. En general, los sensores presentados en este trabajo han sido desarrollados mediante el empleo de técnicas electroquímicas (CV y cronoamperometria), mientras que la caracterización de los mismos ha sido llevada a cabo mediante el uso de técnicas electroquímicas, espectroscópicas y microscópicas, entre otras. También se presentan los métodos de síntesis y de funcionalización que se han utilizado para la preparación de los materiales carbonosos, que posteriormente conformarán los distintos sensores, así como los parámetros analíticos empleados para evaluar la calidad de los resultados obtenidos.

2. Materiales y reactivos

2.1. Reactivos

Todas las disoluciones han sido preparadas empleando agua ultrapura (H_2O , 18 $\text{M}\Omega$ cm, 25°C) obtenida de un sistema ELGA Lab Water Purelab. Como electrolito soporte se emplearon disoluciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%) suministrado por Merck, y disoluciones tamponadas a pH 7.0 preparadas con dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 , 99.5%) e hidrógeno fosfato de dipotasio (K_2HPO_4 , 99.8%), suministrados por Emsure® y Sigma-Aldrich, respectivamente. Otros disolventes empleados han sido: etanol

(Sigma-Aldrich), dimetilformamida (DMF, Sigma-Aldrich), isoforona (Alfa Aesar), ácido nítrico (HNO_3 , Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl, Sigma-Aldrich), ácido perclórico (HClO_4 , VWR Chemicals), ácido acético glacial (Panreac) y éter (Sigma-Aldrich).

Los siguientes reactivos han sido obtenidos de Sigma-Aldrich: sal sódica de mononucleótido de flavina (FMN, 73-79%), ácido úrico (cristalino, $\geq 99\%$), ácido L-ascórbico (cristalino, 99%), hidrocloreuro de dopamina, epinefrina, glucosa, poliestirensulfonato (PSS), polivinilpirrolidona (PVP), etilenglicol anhidro, tetracloroaurato sódico dihidratado ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), metanol, hidróxido sódico (NaOH, 99.9%), disolución al 5% de nafion® 117, chitosan, glutaraldehido (50%), politetrafluoroetileno, glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger*, albúmina de suero bovino (BSA), ferrocianuro potásico ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ácido hexacloroplatínico (H_2PtCl_6), hexacloroplatinato potásico (K_2PtCl_6), borohidruro de sodio (NaBH_4), permanganato potásico (KMnO_4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El hidróxido sódico (NaOH, análisis) y el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA) han sido obtenidos de Merck. El Ecoflex® 00-30 ha sido suministrado por Smooth-On, el poliuretano (PU) por Tecoflex SG-80A y de HPS Papiro se obtuvo el papel para tatuajes temporales. La tinta de Ag/AgCl (E2414) fue proporcionada por Ercon Inc. Electron Microscopy Sciences proporcionó el adhesivo de epóxido de plata, mientras que el polímero *Fabric Glue* ha sido suministrado por Aleene's.

2.2. Materiales carbonosos

Cuatro materiales carbonosos han sido empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral: grafito, hCNTs, grafeno y GO. Los dos primeros se encuentran disponibles comercialmente y han sido empleados sin ninguna purificación posterior. El grafito ha sido suministrado por ACROS Organics (A Thermo Fisher Scientific), y los hCNTs con una pureza del 95% a través de Sigma-Aldrich.

El grafeno y GO han sido preparados en el laboratorio, siendo el grafito mencionado anteriormente el precursor de estos materiales. Los métodos de síntesis de estos materiales se especifican en la sección 5 de este capítulo. Además, todos los materiales han sido posteriormente funcionalizados, algunos con nanopartículas metálicas (grafito, grafeno y GO), mientras que los hCNTs han sido modificados con una fuente de nitrógeno como el ácido 4-aminobenzoico (4-ABA). El efecto de la presencia de Pt-NPs en materiales carbonosos ha sido evaluado empleando grafito y grafeno modificado con riboflavina (Gr-FMN), obteniéndose los materiales Pt-graphite y Pt-Gr-FMN, mientras que el GO ha sido funcionalizado con Au-NPs (Au-GO). Los procedimientos seguidos para llevar a cabo estas modificaciones pueden encontrarse en la sección 5.3 de este capítulo.

2.3. Electrodo empleados

Los materiales mencionados anteriormente han sido evaluados como posibles materiales electroactivos para su aplicación en sensores y biosensores electroquímicos. Para la evaluación de los materiales Gr-FMN, Pt-Gr-FMN, GO, Au-GO, hCNTs y hCNTs-4ABA, se lleva a cabo la modificación

de unas redes de microelectrodos interdigitados de oro (Au-IDA), que son suministradas por la casa comercial Micrux. Estas redes constan de dos redes de microbandas, un contraelectrodo y un electrodo de pseudo-referencia, todos ellos de Au. Para la modificación de los Au-IDA, se preparan dispersiones de los materiales preparados y se procede a la adición de volúmenes (0.5 μL) de las mismas (*drop-casting*) sobre la superficie del Au-IDA, que actúa como soporte del material carbonoso desarrollado.

La evaluación de los materiales electroactivos grafito y Pt-grafito, difiere notablemente del resto ya que para estos materiales se procede mediante la preparación de tintas electroactivas flexibles que son posteriormente impresas en un sustrato también flexible (Capítulo 6).

A continuación, se indican los electrodos que se han empleado a lo largo de esta Tesis Doctoral (Gr-FMN/Au-IDA, Pt-Gr-FMN/Au-IDA, GO/Au-IDA, Au-GO/Au-IDA, hCNTs/Au-IDA, hCNTs-4ABA/Au-IDA) (Capítulos 3-5) y *graphite* y *Pt-graphite line electrodes* (Capítulo 6).

2.4. Muestras reales

Debido a que la aplicabilidad de los sensores es la detección y cuantificación de analitos de interés en muestras reales donde éstos suelen estar presentes, los sensores desarrollados en esta Tesis Doctoral se han empleado para analizar AA, UA y glucosa en muestras fisiológicas, incluyendo matrices de sudor, orina, suero y sangre. Estas muestras han sido recogidas de 6 personas distintas (3 mujeres y 3 hombres) sin ninguna

enfermedad diagnosticada (salvo que se indique lo contrario), con edades comprendidas entre 26 y 38 años.

3. Técnicas de caracterización

3.1. Técnicas electroquímicas

3.1.1. Introducción

Las técnicas electroquímicas han sido ampliamente empleadas en el ámbito de los sensores debido a las excepcionales ventajas que presentan con respecto a otros procedimientos. Las técnicas electroquímicas suelen proporcionar una respuesta rápida, así como límites de detección excepcionalmente bajos, sensibilidades elevadas, además de ser de uso relativamente sencillo y el coste del instrumental necesario es menor que para otro tipo de técnicas analíticas [1–3].

Las técnicas electroquímicas permiten analizar los procesos que ocurren en la superficie de un electrodo (electrodo de trabajo), que se encuentra sumergido en un electrolito. La información que proporciona esta técnica viene dada por la corriente eléctrica (i) que circula a través del electrodo como respuesta a un estímulo en una determinada escala de tiempo. Este estímulo consiste en una diferencia de potencial aplicada respecto a otro electrodo (no polarizable, electrodo de referencia). La corriente medida sobre el electrodo presenta un doble origen, ya que comprende la intensidad medida por la migración de iones para compensar cargas fijas en la superficie del electrodo (fenómenos capacitivos), así como la intensidad generada por moléculas que participan en una reacción de oxidación-

reducción como resultado del potencial electroquímico aplicado (fenómenos farádicos).

Todos los estudios electroquímicos realizados en esta Tesis Doctoral han sido llevados a cabo haciendo uso de la configuración de celda electroquímica de 3 electrodos (Figura 2.1). La celda electroquímica está formada, básicamente, por un recipiente de vidrio (celda) con cuatro bocas, en las que se encuentran sumergidos: un pasador de gases, un *luggin* y los electrodos necesarios para realizar las medidas electroquímicas. Como puede observarse en la Figura 2.1, el pasador de gases se emplea con el propósito de desoxigenar la celda electroquímica, ya que mediante el uso de una corriente de N_2 (g) se puede eliminar el oxígeno tanto de la disolución como de la atmósfera de la celda electroquímica. Por otra parte, los electrodos necesarios para llevar a cabo las técnicas electroquímicas se indican a continuación:

- Electrodo de referencia (RE): se emplea para mantener constante el potencial de electrodo de trabajo respecto al potencial del RE. Los electrodos de referencia más ampliamente empleados actualmente son los electrodos acuosos comerciales de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), que consisten en un hilo de Ag sobre el que se ha depositado AgCl, sumergido en una disolución saturada de cloruro potásico (KCl). También son muy empleados los electrodos de referencia de hidrógeno, basados en un burbujeo de H_2 sobre un electrodo de negro de Pt sumergido en una disolución con electrolito soporte (NHE para pH 0, *Normal Hydrogen Electrode*, y RHE para pH igual al de la disolución de trabajo, *Reversible Hydrogen Electrode*). En ocasiones, la mejor opción es emplear un electrodo

de pseudo-referencia, como un hilo de Ag o Pt, combinado con una sonda como el ferroceno. En esta Tesis Doctoral se han empleado el RE reversible de hidrógeno (RHE), RE de Ag/AgCl y un pseudo-electrodo de referencia de Ag/AgCl. Con el objetivo de evitar la contaminación del RE cuando se adicionen los diferentes analitos sobre el electrolito soporte, se hace uso de un *luggin*, que permite que el RE este sumergido en el electrolito, pero evita el contacto con los analitos que se adicionen a la celda posteriormente.

- Electrodo auxiliar o contra-electrodo (CE): ha de ser un electrodo relativamente inerte y con una elevada área superficial. Generalmente, suele emplearse un hilo de Pt. Es altamente recomendable que el contra-electrodo sea del mismo material que el electrodo de trabajo. En esta Tesis Doctoral se han empleado como contra-electrodos los siguientes materiales: hilo de Pt, hilo de Au y una tinta flexible de grafito.

- Electrodo de trabajo (WE): en este electrodo es donde ocurre la reacción electroquímica que se desea estudiar. Todos los materiales carbonosos mencionados anteriormente han sido empleados como WE a lo largo de esta Tesis Doctoral (sección 2.3).



Figura 2.1. Esquema de la configuración de celda electroquímica de 3 electrodos.

En la mayoría de los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se han empleado técnicas electroquímicas, no solo para caracterizar el material desarrollado, sino también para establecer una relación entre la intensidad medida con la concentración de analito que se desea cuantificar, esto es, para construir las curvas de calibrado que rigen el comportamiento del sensor con la concentración de analito. Las técnicas empleadas han sido la CV y la cronoamperometría, cuyos fundamentos se encuentran resumidos a continuación. Además, debido a que la limpieza del material en este tipo de técnicas es de vital importancia, también se incluye el protocolo de limpieza a seguir para eliminar cualquier contaminación que pueda interferir en la obtención de los resultados.

3.1.2. Protocolo de limpieza

El grado de limpieza del material empleado queda siempre supeditado por el uso al cual se vaya a destinar. En el caso de las técnicas electroquímicas una adecuada limpieza del material de vidrio es altamente recomendable. Con el objetivo de eliminar los posibles contaminantes presentes en el material de vidrio, se establece el siguiente protocolo de limpieza:

- 1) Eliminación de materia orgánica mediante una mezcla oxidante. Para ello, se sumerge el material de vidrio en una disolución ácida concentrada de permanganato potásico durante 2 horas (30 g KMnO_4 + 5 mL H_2SO_4 (96 wt%) en 2 L de agua). De este modo, la materia orgánica queda oxidada mientras que el KMnO_4 se reduce, formando el sólido insoluble MnO_2 .

- 2) Aplicación de disolución piraña (mezcla de H_2SO_4 y H_2O_2). En primer lugar, se retira la disolución oxidante, y se sumerge el material en una disolución ácida de H_2O_2 al 10 wt%. De este modo es posible eliminar el MnO_2 formado, el cual se reduce a Mn^{2+} .
- 3) Lavado con agua. Una vez retirada la disolución piraña, el material se lava abundantemente con agua ultrapura (18.2 M Ω cm) para eliminar las sales y los productos de la oxidación.
- 4) Tras el lavado, el material de vidrio se sumerge de nuevo en agua ultrapura y se hierve en placa calefactora o microondas, con el objetivo de eliminar aquellos contaminantes que puedan haber quedado adheridos en las paredes del material. Este procedimiento se repite tres veces, dejando enfriar el material finalmente, el cual está listo para ser utilizado.

3.1.3. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica o voltametría cíclica (CV, *Cyclic Voltammetry*) es una de las técnicas electroquímicas más empleadas en el estudio de especies electroactivas. Entre las ventajas de esta técnica destacan su versatilidad y fácil aplicación, lo que conlleva que la CV sea ampliamente utilizada en los campos de la electroquímica, química inorgánica, química orgánica y bioelectroquímica.

Fundamentalmente, la CV consiste en la aplicación de un potencial a un WE, el cual se encuentra sumergido en una disolución (electrolito soporte), midiendo la intensidad de corriente (i) resultante entre el WE y el CE. La

Figura 2.2A muestra la función de onda triangular E-t correspondiente a un experimento de CV, donde el potencial aplicado varía linealmente con el tiempo desde un potencial inicial (E_1), y alcanzando un potencial máximo (E_2) y mínimo (E_3), donde la pendiente corresponde a la velocidad de barrido aplicada.

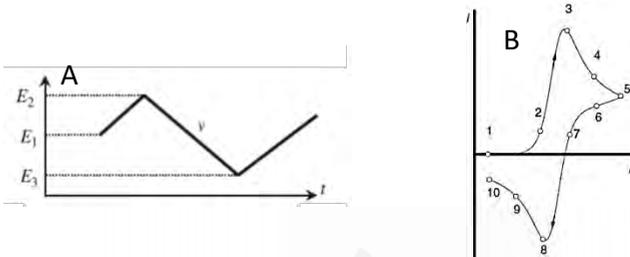


Figura 2.2. A) Diagrama potencial-tiempo. B) Voltamperograma típico de una especie redox en disolución (Fuente: Ref: [4]).

Al presentar gráficamente la intensidad de corriente (i , eje vertical) frente al potencial aplicado (E , eje horizontal) se obtiene un voltamperograma o voltagrama. La Figura 2.2B muestra la respuesta típica de un proceso farádico de una especie reducida en disolución. Como puede observarse, la corriente aumenta a medida que aumenta el sobrepotencial ($E-E_0'$), hasta que se alcanza el máximo gradiente de concentración para la especie reactiva R, que es el que determina la velocidad de difusión de las moléculas desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. En el máximo de corriente, la concentración de la especie reactiva en la superficie desciende a cero, mientras que el gradiente comienza a disminuir por el empobrecimiento de dicha especie en el entorno del electrodo. En el barrido catódico, la cercanía del electrodo se ha enriquecido en la especie oxidada y la reducción de esta especie produce la corriente negativa observada en el voltagrama.

Además de estos procesos farádicos, también interviene la contribución capacitiva por la formación de la doble capa en la interfase electródica, producida por la migración de iones para compensar la creciente densidad de carga de la superficie del electrodo. Esta corriente base tiene signo positivo en el barrido anódico (hacia potenciales más positivos) y negativo en el barrido catódico (hacia potenciales menos positivos). A esta contribución se le denomina comúnmente “doble capa eléctrica o capacitiva” y su magnitud en culombios (carga encerrada) está relacionada con el área activa real del electrodo. Por tanto, cuando se desea estimar la corriente de pico correspondiente a un proceso farádico es necesario trazar una línea base para la sustracción de la corriente de fondo relacionada con los procesos capacitivos.

3.1.4. Cronoamperometría

La cronoamperometría consiste en aplicar un salto de potencial sobre el WE, desde un potencial inicial E_1 , al cual no tienen lugar procesos farádicos, hasta un potencial final E_2 , al cual la concentración de especies electroactivas en la superficie es cero, registrándose como varía la intensidad de corriente con el tiempo (Figura 2.3A).

La curva $i-t$ registrada (Figura 2.3C), refleja los cambios en el gradiente de concentración en las vecindades de la superficie (Figura 2.3B), donde la caída de la corriente (para un electrodo plano) decae con el tiempo, de acuerdo a la ecuación de Cottrell (Figura 2.3C), que viene dada por la Ecuación 2.1.

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Esto se debe a que cuando se somete al electrodo a un potencial E_2 , el analito presente en la disolución se reduce rápidamente, generando un gradiente de concentración que provoca que el analito difunda desde el seno de la disolución hasta el electrodo, donde se reduce inmediatamente. El flujo de analito, así como la corriente, son proporcionales al gradiente de concentración en la superficie del electrodo. Es importante resaltar como el continuo flujo de analito hacia la superficie hace que se genere una zona más gruesa donde no hay analito, de modo que la pendiente del perfil de concentraciones disminuye con el tiempo, ocurriendo lo mismo con la intensidad de corriente [4].

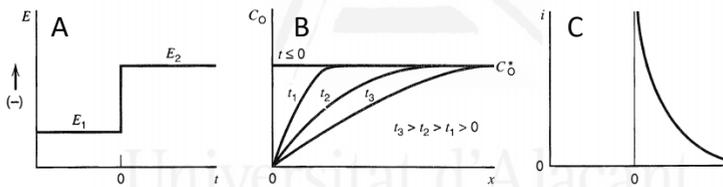


Figura 2.3. A) Forma de la señal para un salto de potencial en el que la especie O no es electroactiva al potencial E_1 , pero se reduce a un potencial E_2 . B) Perfil de concentración para varios tiempos. C) Representación de la intensidad de corriente frente al tiempo (Fuente: Ref. [5]).

Esta técnica es ampliamente empleada con diversos fines. Por ejemplo, se utiliza para determinar los coeficientes de difusión de especies electroactivas o para estudiar mecanismos de reacción. En la presente Tesis Doctoral la técnica se ha empleado, fundamentalmente, con el objetivo de relacionar la corriente medida con la concentración de analito en la disolución. De este modo pueden prepararse curvas de calibrado que permitan correlacionar ambas variables.

3.2. Técnicas microscópicas

3.2.1. Introducción

La microscopía electrónica es una técnica instrumental que emplea haces de electrones muy acelerados y de muy elevada energía (desde cientos de eV hasta decenas de keV) con el objetivo de conocer las características de la materia a escala nanométrica.

Todas estas técnicas se basan en la interacción de la radiación de electrones con la muestra. Esta interacción produce una serie de radiaciones secundarias como: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación de rayos X, electrones Auger, catodoluminiscencia y energía absorbida (por la muestra). La interacción que se va a evaluar se escoge en función de la información que se desea conocer: morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc. En la Figura 2.4 se muestra un esquema que incluye los diferentes tipos de interacciones electrón-materia.

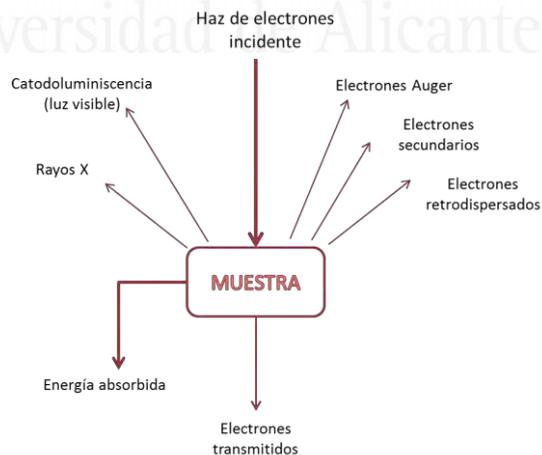


Figura 2.4. Tipos de interacción electrón-materia.

Las técnicas microscópicas que se han empleado son: microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido por Emisión de Campo (FESEM). No obstante, debido a que la técnica FESEM presenta las mismas bases que la microscopía electrónica de barrido (SEM), también se presenta un resumen de los principios en los que se basa esta técnica.

3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) es una técnica de caracterización que proporciona información morfológica y estructural de la muestra. Se basa, principalmente, en irradiar una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía se encuentra entre 100 y 200 keV. Parte de estos electrones son transmitidos, otros son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios, electrones Auger y rayos X, entre otros. La técnica TEM se basa en la transmisión y dispersión de los electrones para formar imágenes, siendo la difracción de los electrones la que proporciona información acerca de la estructura cristalina, mientras que la emisión de rayos X característicos permite conocer la composición elemental de la muestra [6–9].

Las muestras analizadas mediante esta técnica han de ser suficientemente delgadas, es decir, transparentes a los electrones. Es recomendable no utilizar muestras de más de 10 nm de grosor, ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra más alta será la calidad de la imagen obtenida.

Los microscopios electrónicos más sencillos constan de dos lentes cuyo propósito es la formación de la imagen, la cual se construye de manera similar que en los microscopios ópticos convencionales. La iluminación proviene de un cañón de electrones emitidos por un filamento de wolframio (W) o hexaboruro de lantano (LaB_6). Los electrones son acelerados al aplicar un potencial negativo y enfocados mediante dos lentes condensadoras sobre una muestra delgada, transparente a los electrones. Después de pasar a través de la muestra, los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetivo dentro de una imagen intermedia ampliada. Las lentes proyectoras amplifican más la imagen, la cual es proyectada sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica.

La preparación de la muestra consiste en la dispersión de la misma en etanol, que posteriormente es depositada sobre una rejilla de carbón o metálica, para ser introducida en el microscopio.

Las imágenes TEM de los materiales desarrollados en esta Tesis Doctoral han sido obtenidas a partir de un microscopio marca JEOL modelo JEM-2010 de 200 kV, equipado con un detector de rayos X marca OXFORD modelo INCA Energy TEM 100 para microanálisis (EDX). La cámara de adquisición de imágenes es de la marca GATAN modelo ORIUS SC600 y está montada en eje con el microscopio en la parte inferior e integrada dentro del programa de adquisición y tratamiento de imágenes GATAN DigitalMicrograph 1.80.70 para GMS 1.8.0.

3.2.3. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica que permite visualizar la morfología de muestras sólidas sobre el límite físico de la óptica, permitiendo una resolución de unos miles de Å, dependiendo de la naturaleza de la muestra. La técnica se basa en hacer incidir un haz de electrones sobre la superficie de la muestra y mediante un detector se detectan los electrones secundarios y retrodispersados. El haz se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones x e y , de tal modo que la intensidad de la imagen varía en cada punto con la intensidad del haz de electrones generado en la superficie. Los electrones arrancados de los átomos de la muestra son denominados electrones secundarios, los cuales proporcionan información acerca de la topografía superficial. Estos electrones secundarios tienen una baja energía (menos de 50 eV), que además van perdiendo debido a las interacciones que sufren en su camino al exterior de la muestra. Como consecuencia, solo los electrones secundarios que están muy próximos a la superficie llegarán al detector. Por tanto, la señal de los electrones secundarios procede de la misma superficie y de una ínfima zona por debajo de ella (del orden de 5 nm a 10 nm). Por otra parte, los electrones que rebotan elásticamente sobre la superficie se denominan retrodispersados. Su energía es superior a 50 eV y proceden de una profundidad mayor que en el caso de los electrones secundarios. La intensidad de la señal de electrones retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico (Z) de los átomos del material. Este hecho permite, a partir de diferencias de intensidad, distinguir fases de material de diferente

composición química, aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas.

Las muestras deben encontrarse perfectamente secas antes de ser introducidas en el microscopio, y ésta además ha de ser conductora, ya que, de no ser así la muestra se cargará durante la irradiación por una acumulación de carga que desvía el haz electrónico y, como consecuencia de ello, aparecerán distorsiones en la imagen. Para evitar este fenómeno en muestras no conductoras se recubren las mismas de una película conductora, de espesor comprendido entre 10 y 25 nm. El material con el que se recubra la muestra dependerá, fundamentalmente, del estudio que se desea realizar. Así, para la observación de imágenes de electrones secundarios, el Au y Au-Pd son los materiales que ofrecen mejores resultados, ya que al ser más pesados producen mayor emisión. Sin embargo, cuando se desea realizar un estudio microanalítico es recomendable emplear carbono, ya que el bajo número atómico de este elemento lo hace prácticamente transparente a los rayos X emitidos por la muestra.

3.2.4. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, *Field Emission Scanning Electron Microscopy*), es un instrumento que al igual que el microscopio SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un intervalo de energía mucho mayor. El funcionamiento se basa en hacer incidir un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que

en un monitor se visualiza la información que interesa en función de los detectores disponibles. Utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales (de 0.02 kV a 30 kV), permitiendo observar muestras sensibles al haz de electrones sin dañarlas y minimizando los efectos de carga. Además, es importante destacar que los equipos FESEM disponen de detectores dentro de la lente, optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración.

Las imágenes FESEM presentadas en esta Tesis Doctoral han sido obtenidas mediante un microscopio FESEM marca ZEISS modelo Merlin VP Compact equipado con un sistema de microanálisis por EDX marca BRUKER modelo Quantax 400. La resolución que alcanza es 0.8 nm a 15 kV y 1.6 nm a 1 kV.

3.3. Técnicas espectroscópicas de análisis de superficies

3.3.1. Introducción

Las técnicas espectroscópicas de superficies informan tanto cualitativamente como cuantitativamente sobre la composición química de la capa superficial de un sólido que tiene unos pocos angstroms o décimas de angstroms de espesor. La manera general de llevar a cabo el examen espectroscópico de una superficie se muestra en la Figura 2.5, que consiste en irradiar la muestra sólida con un haz primario de fotones, electrones, iones o moléculas neutras. El haz secundario, que es consecuencia de un proceso de dispersión de evaporación por bombardeo o de emisión, llega al espectrómetro, donde será analizado [1].

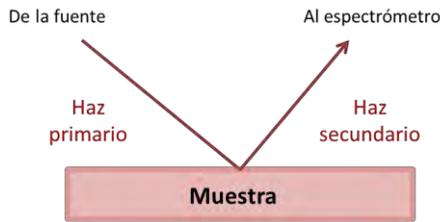


Figura 2.5. Esquema general de la espectroscopia de superficies. El haz puede ser de fotones, electrones, iones o moléculas neutras.

Las técnicas espectroscópicas se clasifican en función de la naturaleza de los haces primario y secundario, dando lugar a las técnicas que se muestran en la Tabla 2.1, entre otras muchas [10].

Tabla 2.1. Tipos de técnicas espectroscópicas para el análisis de superficies.

Método	Haz primario	Haz secundario
Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	Fotones de rayos X	Electrones
Espectroscopia de electrones Auger (AES)	Electrones o fotones de rayos X	Electrones
Espectrometría de masas de ion secundario (SIMS)	Iones	Iones
Microsonda de electrones (EM), Espectroscopia de rayos X de dispersion de energía (EDX)	Electrones	Fotones de rayos X

A lo largo de este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio de la composición de la superficie de los materiales desarrollados mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) y mediante un espectrómetro de dispersión

de energías de rayos X (EDX) incluido en el microscopio FE-SEM, por lo que a continuación se presentan los principios generales en que están basadas estas técnicas.

3.3.2. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X

La técnica de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*) es una técnica ampliamente empleada para la caracterización superficial de materiales, ya que proporciona información cuantitativa sobre la composición elemental, las especies químicas y sus estados de oxidación en la superficie de un material. Es considerada como una técnica de caracterización superficial debido a que la profundidad del análisis está limitada a 1-3 nm. La técnica consiste, básicamente, en irradiar una muestra con un haz monocromático de rayos X, registrándose la energía cinética de los electrones emitidos. La Figura 2.6 muestra una representación del proceso físico implicado en XPS, donde se observa como uno de los fotones, cuya energía es $h\nu$, desplaza a un electrón de un orbital K de energía BE [1].

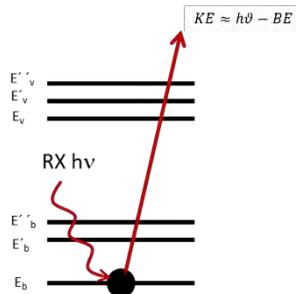


Figura 2.6. Esquema del proceso XPS.

Esta reacción puede representarse del siguiente modo (Esquema 2.1):



Donde A puede ser un átomo, una molécula o un ion y A^{+*} es un ion electrónicamente excitado con una carga positiva más que A. Mediante un espectrómetro de electrones se mide la energía cinética del electrón emitido (KE), a partir de la cual puede calcularse la energía de ligadura del electrón (BE), haciendo uso de la Ecuación 2.2.

$$BE = h\nu - KE - w \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde w es la llamada función de trabajo del espectrómetro, un factor de corrección del entorno electrostático en el que el electrón se forma y se mide. La BE del electrón es característica del átomo y del orbital en el que se encontraba el electrón que se ha emitido, lo que permite obtener información tanto sobre la composición atómica de la muestra, como de la estructura y el grado de oxidación de los compuestos que están siendo estudiados. Los resultados se muestran en un espectro XPS, que consiste en la representación de la velocidad de recuento de electrones en función de la BE. En general, la BE es tanto mayor cuanto más alto es el estado de oxidación del elemento.

La instrumentación, un espectrómetro de electrones, consta de una fuente de rayos X, un dispositivo para contener la muestra, un analizador, un detector, un procesador de señal y un dispositivo de lectura. Los experimentos han de realizarse en condiciones de Ultra Alto Vacío (UHV), lo que se consigue mediante el uso de bombas turbo-moleculares y bombas iónicas apoyadas con vacíos previos obtenidos por bombas rotatorias de aceite. Los experimentos XPS realizados durante esta Tesis Doctoral han

sido realizados mediante un espectrómetro VG-Microtech Multilab 3000, equipado con una fuente de rayos-X de Mg $K\alpha$ (1253.6 eV). La posición del pico correspondiente a C1s se define en 284.6 eV y ha sido empleada como referencia para la posición de los picos en todos los espectros.

3.3.3. Espectroscopia de rayos X de dispersión de energía

La espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDX, *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) es una técnica analítica robusta empleada para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. El fundamento en el que está basada es muy similar al indicado en la sección 3.3.2., ya que los resultados que se obtienen mediante el uso de esta técnica están basados en que los niveles de energía característicos de la emisión de fotones son únicos y en los electrones que se emiten de los átomos. Estas características permiten identificar los átomos presentes en la muestra que se está analizando. Cuando un electrón o fotón incide sobre un átomo sin excitar, un electrón de una de las capas internas es emitido generando un hueco en dicha capa. Entonces, un electrón de una capa más externa ocupa ese hueco con la consecuente pérdida de energía que se emite como rayos X (Figura 2.7).

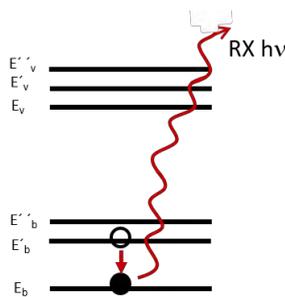


Figura 2.7. Esquema del proceso EDX.

Esta técnica suele encontrarse acoplada con técnicas microscópicas como SEM o TEM. El análisis químico en un microscopio SEM se realiza midiendo la distribución de energía e intensidad de la señal de rayos X generada por el haz de electrones incidente [11,12].

3.4. Técnicas de tratamiento térmico

3.4.1. Introducción

Se definen como técnicas de tratamiento térmico a aquellos métodos en los que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura, mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlado [13]. Dada esta definición, se pueden distinguir más de una decena de técnicas, que se diferencian en las propiedades medidas y en los programas de temperatura que se aplican. En esta Tesis Doctoral, se han evaluado los grupos funcionales existentes en la muestra de hCNTs mediante la técnica de desorción a temperatura programa (TPD). A continuación, se presentan los principios en los que se fundamenta esta técnica.

3.4.2. Desorción a temperatura programada

La desorción a temperatura programa (TPD, *Temperature Programmed Desorption*) es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de los grupos funcionales presentes en la superficie de los materiales carbonosos. La técnica consiste en el análisis de los gases emitidos cuando el material carbonoso es sometido a un programa de temperatura en atmósfera inerte. Estos gases producidos son detectados, en la mayoría de

ocasiones por un cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas. El análisis de los gases emitidos por la muestra aporta información sobre la composición química y estabilidad del mismo.

La descomposición de los grupos superficiales oxigenados de los materiales carbonosos sometidos a tratamientos térmicos en atmósfera inerte, ha sido ampliamente utilizada en la caracterización de los grupos superficiales de los materiales carbonosos porosos [14,15]. Los grupos funcionales oxigenados que pueden existir en la superficie de los materiales presentan diferente estabilidad térmica, y los gases desprendidos durante su descomposición térmica (monóxido de carbono (CO), CO₂ y H₂O) son diferentes dependiendo del grupo funcional del que proceden. Es conocido que la evolución del CO está relacionada con la descomposición de grupos neutros y básicos como carbonilos, quinonas y éteres, entre otros. Estos grupos pueden ser identificados debido a que presentan diferentes temperaturas de descomposición [16,17]. En cambio, la desorción de CO₂ está principalmente relacionada con la descomposición de grupos carboxilo, anhídrido o lactonas. De igual modo, los grupos funcionales nitrogenados también pueden ser evaluados siguiendo la evolución de gases nitrogenados que se forman durante su descomposición térmica [18].

Los análisis por TPD que se presentan en esta Tesis Doctoral han sido llevados a cabo en un equipo DSC-TGA (TA Instruments, SDT 2960 Simultaneous) acoplado a un espectrómetro de masas (Thermostar, Balzers, GSD 300 T3). En los experimentos, la termobalanza ha sido purgada durante 2 h en atmósfera de helio a 100 mL min⁻¹ y entonces calentada desde 120°C hasta 950°C empleando una velocidad de calentamiento de 20°C min⁻¹.

4. Métodos para la evaluación de la calidad de las medidas

Debido a que el objetivo principal del desarrollo de sensores es la aplicación para análisis cuantitativo de determinados analitos, es necesario que los resultados posean la calidad adecuada. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han determinado los parámetros analíticos, cuya finalidad es la evaluación de la calidad de las medidas realizadas; por ello, a continuación, se presenta su definición y el modo de calcularlos.

4.1. Estadística de medidas repetidas

4.1.1. Media y desviación estándar

La media de la muestra (\bar{x}) se define como el promedio de un conjunto finito de datos, y se calcula como la suma de todas las medidas dividida por el número de medidas (n) (Ecuación 2.3).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

La desviación estándar (s) se emplea para evaluar la precisión o repetibilidad de los resultados, es decir, la concordancia entre los valores numéricos de dos o más medidas replicadas que se han realizado exactamente de la misma forma. Puede calcularse a partir de la Ecuación 2.4.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

4.1.2. Intervalo de confianza de la media

Los resultados experimentales cuantitativos carecen de interés si no van acompañados de una estimación de los errores involucrados en su medida. Una práctica usual en la literatura de química analítica es citar la media como la estimación de la cantidad medida (\bar{x}) y a la desviación estándar como la estimación de la precisión (s). Sin embargo, otra opción sería estimar la precisión como el intervalo de confianza que es el modo en el que se han presentado los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral. Para muestras pequeñas, el intervalo de confianza de la media viene dado por la Ecuación 2.5.

$$\bar{x} \pm \frac{t_{n-1}s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde, como ya se ha visto, \bar{x} corresponde al valor medio, t al valor de la distribución *t de Student*, s a la desviación estándar, la cual constituye un modo de determinar la variabilidad de los valores obtenidos y n es el número de repeticiones. El subíndice ($n-1$) indica que t depende de esta cantidad, que se conoce como el número de grados de libertad. El término “grados de libertad” se refiere al número de desviaciones independientes ($x_i - \bar{x}$) que se utilizan al calcular s . En este caso dicho número es ($n-1$), porque cuando se conocen ($n-1$) desviaciones, la última se puede deducir ya que $\sum_i(x_i - \bar{x}) = 0$. Además, el valor de t depende también del grado de confianza requerido, que ha sido establecido al 95% de la media para los resultados presentados en esta Tesis Doctoral.

4.2. Validación del método: métodos de calibración

4.2.1. Calibración externa

El método de calibración externa se emplea cuando la muestra real no presenta efectos de matriz, y consiste en la determinación de la recta de calibrado mediante el uso de patrones de calibración preparados en agua. En función de la variación de los errores con la concentración de analito, se diferencian dos tipos de calibración externa: calibración no ponderada y ponderada.

4.2.1.1. Calibración no ponderada

La curva de calibrado es el resultado de la representación de los valores de y (señal medida) frente a los valores de x (concentración de analito), denominándose recta de calibrado si existe entre una relación lineal entre las dos variables. La recta de calibrado tiene la forma: $y = a + bx$, donde b es la pendiente de la recta y a la ordenada en el origen. Para calcular el valor de la pendiente y la ordenada en el origen se emplea el método de mínimos cuadrados, que calcula los parámetros de la curva (a, b) aplicando la condición de mínimo a la varianza de los puntos alrededor de la recta [19]. La Ecuación 2.6 y la Ecuación 2.7 permiten calcular el valor de la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente.

Pendiente de la recta (b):

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde x_i e y_i corresponden a los valores experimentales de x e y , y \bar{x} e \bar{y} a los valores medios obtenidos de x e y .

Ordenada en el origen de la recta (a):

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r , que viene dado por Ecuación 2.8.

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Además, es necesario tener en cuenta que los errores aleatorios en los valores de la pendiente y ordenada en el origen son importantes, y para determinar su valor, es necesario, calcular, en primer lugar, el estadístico $s_{y/x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección y (Ecuación 2.9).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

Donde N es el número de patrones, e \hat{y}_i el valor de y calculado de acuerdo a la ecuación de la recta obtenida.

Para el cálculo de las incertidumbres de los parámetros de regresión se utilizan las siguientes expresiones (Ecuación 2.10 y Ecuación 2.11).

Incetidumbre en la pendiente de la recta:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

Incetidumbre en la ordenada en el origen:

$$s_a = s_b \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{N}} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

Una vez se han calculado las incertidumbres de los parámetros de la recta, el intervalo de confianza se puede conocer fácilmente mediante la aplicación de la Ecuación 2.12.

$$y = (a \pm t_{(n-2,p)} s_a) + (b \pm t_{(n-2,p)} s_b) x \quad \text{Ecuación 2.12}$$

4.2.1.2. Calibración ponderada

En la mayoría de ocasiones, los errores (barras de error) en la curva de calibrado en la dirección y son aproximadamente igual para todos los puntos, mostrando un comportamiento homocedástico y siendo válidas las ecuaciones enunciadas en la sección 4.2.1.1. (calibración no ponderada). Sin embargo, en algunas ocasiones los errores aumentan con la concentración de analito, describiendo un comportamiento heterocedástico, cuyos datos requieren el uso de un método de regresión ponderada. Este método se basa en proporcionar una ponderación adicional a aquellos puntos donde los errores son más pequeños. Las ecuaciones para calcular la pendiente (Ecuación 2.13) y la ordenada en el origen (Ecuación 2.15) se presentan a continuación.

Pendiente de la recta (b_w):

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - N \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - N \bar{x}_w^2} \quad \text{Ecuación 2.13}$$

Donde w_i es el factor de ponderación (Ecuación 2.14):

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2} / N} \quad \text{Ecuación 2.14}$$

Ordenada en el origen de la recta (a_w):

$$a_w = \bar{y}_w - b\bar{x}_w \quad \text{Ecuación 2.15}$$

En las ecuaciones anteriores, \bar{y}_w y \bar{x}_w representan las coordenadas del centro de gravedad ponderado, por el que debe pasar la recta de regresión ponderada. Estas coordenadas vienen dadas por la Ecuación 2.16 y la Ecuación 2.17.

$$\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{N} \quad \text{Ecuación 2.16}$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum w_i y_i}{N} \quad \text{Ecuación 2.17}$$

Finalmente, indicar que los resultados obtenidos para la pendiente y la ordenada en el origen mediante el método ponderado son muy similares a los obtenidos mediante el no ponderado. Sin embargo, para obtener estimaciones de los errores o límites de confianza de las concentraciones, el método de regresión ponderado es el que proporciona los resultados más reales.

4.2.2. Método de adición de estándar

Básicamente, el método consiste en la realización de la curva de calibrado estando la propia muestra presente en los patrones. El procedimiento a seguir se basa en tomar volúmenes iguales de la muestra problema y todas salvo una, son adicionadas separadamente con cantidades conocidas y diferentes de analito, diluyéndose todas ellas hasta el mismo volumen final. A continuación, se mide la señal en el instrumento para todas estas

disoluciones y los resultados se representan en el eje y frente a las concentraciones de analito añadidas, que se sitúan en el eje x (Figura 2.8).

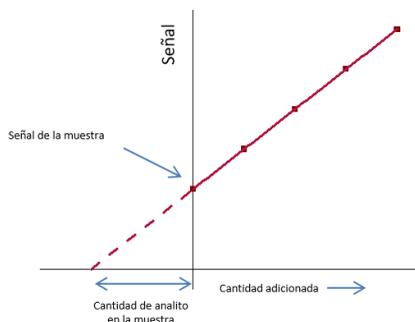


Figura 2.8. Cálculo de la concentración de analito en una muestra problema mediante el método de adición de estándar.

Como puede observarse en la Figura 2.8, la línea de regresión se calcula de la manera habitual, pero la concentración de la muestra se calcula extrapolando al punto del eje x en el que $y = 0$. Este valor negativo sobre el eje x corresponde a la cantidad de analito en la muestra problema, que viene determinado por el cociente entre la ordenada en el origen (a) y la pendiente (b).

4.2.3. Análisis de muestras reales

Durante el desarrollo de un método de análisis, es común que la recta de calibrado se determine mediante el análisis de patrones acuosos (método de calibración externa). Esta recta de calibrado permite calcular la concentración de analito en una muestra (x) a partir de la señal medida (y) (método de calibración externa). Sin embargo, cuando se analizan muestras reales con matrices más complejas que una matriz acuosa, es común que otros componentes presentes en la muestra real provoquen una

interferencia en la señal que se está midiendo, esto es, produciendo un aumento o disminución de la misma. Este fenómeno se conoce como “efecto de matriz” y requiere del uso de otros métodos de calibración, por ejemplo, preparar los patrones de calibración en una matriz que se asemeje a la que posee la muestra real o incluso prepararlos incluyendo la propia muestra (método de adición de estándar). En esta Tesis Doctoral, se han analizado muestras reales empleado el método de calibración externa y el método de adición de estándar. Debido a que la cuantificación de analitos se lleva a cabo a partir de la ecuación de calibrado, cuya pendiente y ordenada en el origen se encuentran sujetas a errores aleatorios, siempre que se determine la concentración de un analito en una muestra problema, ésta debe de ir acompañada del intervalo de confianza, como una estimación del error asociado al cálculo de dicha concentración (Ecuación 2.18).

$$C_{analito} = \bar{x} \pm t_{(N-2)} s_{\bar{x}} \quad \text{Ecuación 2.18}$$

Donde $s_{\bar{x}}$ representa la desviación estándar de los valores de concentración calculados. Su determinación depende del método de calibración que se emplea, por lo que a continuación se muestran las fórmulas empleadas para calcular $s_{\bar{x}}$ cuando se hace uso del método de calibración externa y del método de adición de estándar.

4.2.3.1. Método de calibración externa

El método de calibración externa se emplea cuando la muestra real no presenta efectos de matriz, y permite calcular la concentración de analito

en dicha muestra a partir de la ecuación de la recta de calibrado (pendiente y ordenada en el origen) y conocida la señal proporcionada por la muestra (y). El error asociado a una concentración calculada a partir de una recta de regresión no ponderada (Ecuación 2.19) y a partir de una ponderada (Ecuación 2.20 y Ecuación 2.21) puede calcularse como se muestra a continuación.

No ponderada:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$
 Ecuación 2.19

Ponderada:

$$s_{x_{0w}} = \frac{s_{(y/x)w}}{b} \sqrt{\frac{1}{w_0} + \frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}}$$
 Ecuación 2.20

Donde $s_{(y/x)w}$ viene dado por la ecuación Ecuación 2.21:

$$s_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$
 Ecuación 2.21

Donde m es el número de veces que se ha llevado a cabo el análisis, y_0 es el valor experimental de y a partir del cual se determina el valor de la concentración x_0 y w_0 corresponde a la ponderación adecuada para y_0 .

El método de la calibración externa presenta como ventaja principal, la posibilidad de analizar un gran número de muestras en un tiempo menor, ya que permite el análisis cuantitativo haciendo uso de una única recta de calibrado.

4.2.3.2. Método de adición de estándar

El método de adición de estándar se emplea cuando la muestra problema presenta efectos de matriz, es decir, cuando se produce un aumento o disminución de la señal que se está midiendo por efecto de otros componentes presentes en la muestra. Como la pendiente y la ordenada en el origen se encuentran sujetos a errores, el valor calculado también lo está, cuyo valor puede calcularse a partir de Ecuación 2.22.

$$s_{X_E} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 2.22}$$

Donde N es el número de patrones medidos, siendo necesario un mínimo de 6 patrones. Los límites de confianza se determinan como $x_E \pm t_{(N-2)}s_{X_E}$. El método de adición de estándar ha sido ampliamente empleado por los buenos resultados obtenidos en muestras complejas, pero presenta el gran inconveniente de que es necesario preparar una recta de calibrado para cada muestra a analizar, lo que supone una desventaja cuando se desea analizar un gran número de muestras.

4.3. Validación del método: parámetros analíticos

4.3.1. Sensibilidad

La sensibilidad de un método o instrumento se define como la medida de su capacidad para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de analito. Se establecen dos tipos de sensibilidad: la sensibilidad de calibrado, que se define como la pendiente de la curva de calibrado y la sensibilidad

analítica, que consiste en la pendiente de la curva de calibrado dividida por la desviación estándar de las medidas [1].

4.3.2. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LOD) se define como aquella concentración de analito que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del blanco. Pese a que aún no existe un acuerdo entre investigadores para establecer el modo de estimar el LOD, existen diferentes criterios para determinarlos, siendo el más común como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B (Ecuación 2.23).

$$LOD = y_B + 3s_B \quad \text{Ecuación 2.23}$$

A lo largo de esta Tesis Doctoral, algunos LODs han sido calculados de acuerdo al criterio indicado anteriormente (Ecuación 2.23), pero en la gran mayoría de ocasiones se ha empleado un método empírico, que consiste en la medida progresiva de concentraciones cada vez más diluidas del analito. El límite de cuantificación (LOQ) es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, esto es, la mínima concentración de analito que el método es capaz de cuantificar. El LOQ se calcula habitualmente como la señal del blanco, y_B , más diez veces la desviación estándar del blanco, s_B , dando lugar a la Ecuación 2.24, la cual ha sido empleada a lo largo de esta Tesis Doctoral.

$$LOQ = 3.3 LOD \quad \text{Ecuación 2.24}$$

4.3.3. Intervalo lineal e intervalo de trabajo

El intervalo lineal se define como el intervalo de concentraciones en los que la correlación de la señal medida varía linealmente con la concentración de analito, mientras que el intervalo de trabajo, el cual presenta un mayor interés analítico, se define como el intervalo en el que un método es capaz de cuantificar con una incertidumbre aceptable manteniendo la relación lineal [20]. El límite inferior del intervalo de trabajo corresponde al LOQ del método, mientras que el límite superior es el mismo que en el intervalo lineal, que corresponde con aquella concentración en la que aún no se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

4.3.4. Exactitud: veracidad y precisión

La exactitud de una medición expresa la proximidad de un resultado medido a un valor de referencia. La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los errores sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, en general, la exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión [20]. La veracidad de la medición se define como la proximidad de la media de un número infinito de resultados producidos con el método a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, si se puede llevar a cabo una evaluación práctica de la misma, basada en la comparación de la media de los resultados del método candidato con un valor de referencia adecuado. Existen tres enfoques generales que comprenden el análisis de materiales de referencia, experimentos de recuperación utilizando muestras

adicionadas y comparación de los resultados obtenidos mediante otro método. Debido a la ausencia de materiales de referencia adecuados, en esta Tesis Doctoral se han empleado estudios de recuperación, que consisten en adicionar concentraciones del analito perfectamente conocidas a la muestra problema y calcular que la cantidad añadida es cuantificada adecuadamente por el método propuesto. Su valor viene determinado por el factor de recuperación, que se calcula de acuerdo a la Ecuación 2.25.

$$R (\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{añadido}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.25}$$

Donde \bar{x}' corresponde al valor medio de la cantidad de analito en la muestra calculada después de adicionarse la cantidad de analito conocida y \bar{x} corresponde al valor medio de la concentración de analito en la muestra calculado mediante la ecuación de la curva de calibrado.

A lo largo de este trabajo también se ha realizado la evaluación de la veracidad mediante la comparación de los resultados del método candidato con los obtenidos mediante un método alternativo, que fue realizado por un laboratorio certificado. La ecuación que permite calcular el factor de recuperación se muestra a continuación (Ecuación 2.26).

$$R (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.26}$$

Por otra parte, la precisión es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Las dos medidas de precisión que se pueden obtener son la repetibilidad y la reproducibilidad. En todos los trabajos presentados en este trabajo se ha evaluado la repetibilidad, que supone dar la más pequeña variación en los resultados, ya que es una medida de la variabilidad en los

resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo. La repetibilidad de una medida viene determinada por la desviación estándar relativa (RSD), que se calcula de acuerdo a la Ecuación 2.27.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.27}$$

La reproducibilidad, en cambio, supone que los diferentes resultados han sido obtenidos a partir de diferentes analistas, empleando distintos equipos, distintos dispositivos y distintas disoluciones. Con el objetivo de presentar un concepto intermedio entre repetibilidad y reproducibilidad, se ha definido la reproducibilidad inter-sensor, que consiste en llevar a cabo el análisis con diferentes sensores preparados, pero manteniendo constantes el resto de variables.

5. Preparación de materiales

5.1. Preparación de dispersiones acuosas de grafeno (Gr-FMN)

Con el objetivo de preparar dispersiones acuosas de grafeno lo más concentradas posible, se ha seguido el método de síntesis propuesto por Ayán-Varela et al. [21], el cual emplea como dispersante un derivado de la vitamina B, denominada sal sódica de la riboflavina-5-fosfato ((FMN)). La FMN es un muy buen dispersante debido a que se adsorbe fuertemente sobre las láminas de grafeno mediante el grupo isoaloxazina, a la vez que el grupo fosfato (ribitol), que se encuentra cargado negativamente, proporciona una eficiente estabilización coloidal (Figura 2.9).

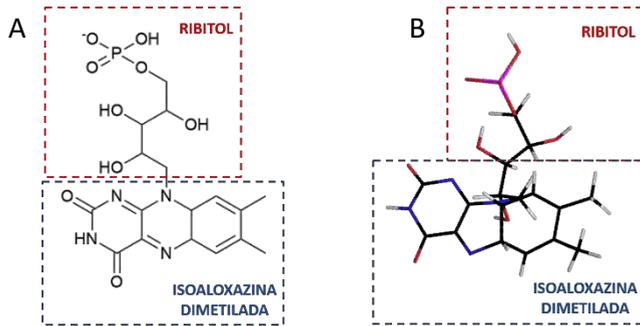


Figura 2.9. Esquema de la FMN en disolución: A) 2D. B) 3D.

Con el objetivo principal de exfoliar el grafito, se añade grafito comercial en una concentración de 30 mg mL^{-1} a una disolución acuosa de FMN de concentración 1 mg mL^{-1} , y seguidamente se sumerge en un baño de ultrasonidos (US) durante 5 h a una potencia de 20 W L^{-1} . Tras la sonicación, la suspensión obtenida es centrifugada a 1500-2300 rpm durante un tiempo de 20 min, con el objetivo de sedimentar aquellos fragmentos que no han sido exfoliados. Transcurrido este tiempo se retira el sobrenadante, es decir, la dispersión acuosa de grafeno estabilizada con FMN (Gr-FMN). La Figura 2.10 muestra la reacción que tiene lugar cuando la disolución de grafito y FMN es sometida a los procesos indicados anteriormente.

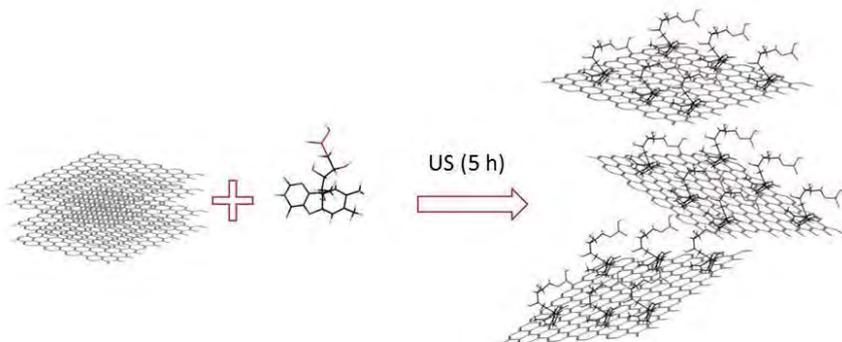


Figura 2.10. Esquema simplificado de la reacción entre grafito y FMN (Gr-FMN).

Finalmente, con el objetivo de eliminar el exceso de FMN de la dispersión, esta se somete a dos procesos de centrifugación a 14600 rpm durante 20 min. De este modo, se producirá la sedimentación de la FMN que esté adsorbida sobre las láminas de grafeno, mientras que la porción de FMN que se encuentra en disolución quedará en el sobrenadante. Para concluir, el grafeno que ha sedimentado se dispersa de nuevo en agua ultrapura.

5.2. Síntesis de óxido de grafeno

La preparación de GO se basa en la oxidación de grafito, llevándose a cabo una exfoliación del mismo. Para la síntesis del GO empleado en este trabajo se ha seguido el método propuesto por Marcano [22], basado en el procedimiento seguido por Hummer, pero con diversas modificaciones que mejoran el rendimiento del proceso. En primer lugar, se mezclan 3 g de grafito comercial con 18 g de KMnO_4 , sobre los cuales se adicionan 400 mL de una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ en una relación 1:9. La mezcla se mantiene a 50°C y con agitación durante 12 h. Transcurrido el tiempo de reacción, la disolución es enfriada a temperatura ambiente, se sumerge en un baño de hielo y se adicionan 3 mL de H_2O_2 al 30%. La disolución obtenida se hace pasar por un tamiz, cuyo tamaño de poro es de $300\ \mu\text{m}$, y a continuación se filtra a través de un filtro de poliéster. Seguidamente se lleva a cabo una etapa de centrifugación del filtrado obtenido (4000 rpm, 4 h), y el sólido obtenido es sometido a una serie de etapas de limpieza (200 mL de agua, 200 mL de HCl al 30%, 200 mL de etanol (2 veces)). Entre cada una de las etapas de lavado, la mezcla es tamizada y filtrada, y el filtrado obtenido es centrifugado (4000 rpm, 4 h), preservando el sólido obtenido para el

siguiente lavado. El material obtenido una vez finalizadas todas las etapas de lavado se suspende en 200 mL de éter, filtrándose la mezcla en un filtro de PTFE con un tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$. Finalmente, el sólido retenido se mantiene en una estufa de vacío a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, el material se encuentra preparado para ser utilizado. La Figura 2.11 consiste en un esquema que muestra de forma simplificada el proceso que tiene lugar durante la síntesis.

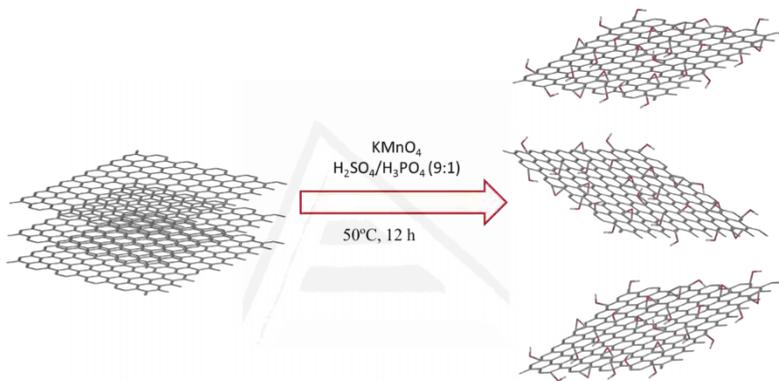


Figura 2.11. Esquema simplificado de la síntesis de GO a partir de grafito (método de Marciano).

5.3. Funcionalización de materiales carbonosos

5.3.1. Funcionalización electroquímica de hCNTs con ácido 4-aminobenzoico

La modificación de los hCNTs se ha realizado siguiendo el procedimiento experimental desarrollado por González-Gaitán et al. [23]. La funcionalización de los hCNTs se lleva a cabo de forma electroquímica mediante una configuración de celda de tres electrodos, en la que el WE es una pasta preparada a partir de los hCNTs, el CE es un hilo de Pt y un

electrodo de Ag/AgCl actúa como RE. La funcionalización se lleva a cabo mediante CV en una disolución 0.1 M de HClO_4 que contiene 1 mM de 4-ABA, aplicándose un total de 10 ciclos entre 0.5 y 1.4 V a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . La Figura 2.12 muestra un esquema donde puede observarse este proceso.

El WE se prepara a partir de una mezcla homogénea de hCNTs y politetrafluoroetileno (PTFE) en proporción 95:5 (w/w), respectivamente. Mediante el uso de un molde se preparan pastillas circulares de hCNTs-PTFE con un peso de 25 mg y 1.5 cm^2 .

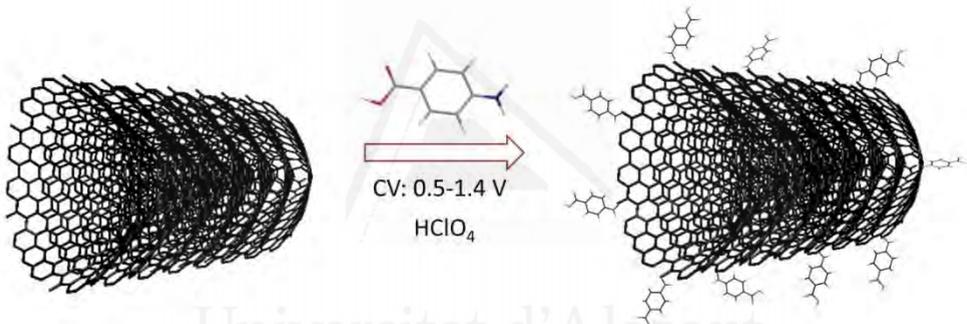


Figura 2.12. Esquema correspondiente a la funcionalización electroquímica de los hCNTs con 4-ABA.

5.3.2. Funcionalización química

5.3.2.1. Síntesis de nanopartículas de oro

Las Au-NPs se han sintetizado sobre GO (Au-GO), actuando el material carbonoso como soporte de estas nanopartículas. Para llevar a cabo esta síntesis se ha seguido el método desarrollado por Domínguez-Domínguez et al. [24] con diversas modificaciones que permiten además de controlar el tamaño de partícula, reducir el uso de agentes reductores. La síntesis se lleva a cabo en atmósfera inerte, con el objetivo de obtener una distribución

de tamaño homogénea, y para ello se hace uso de un dispositivo Schlenk. La Figura 2.13 contiene de forma simplificada el proceso que tiene lugar durante la síntesis de las nanopartículas.

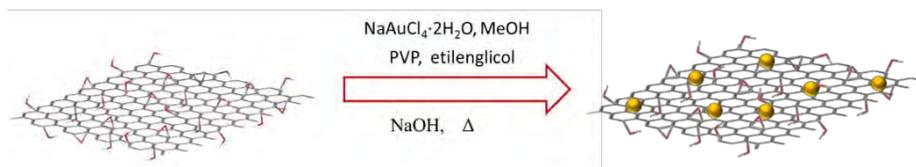


Figura 2.13. Esquema de la síntesis de Au-NPs sobre GO (Au-GO).

En un matraz de fondo redondo se introducen 0.075 g de GO y 0.120 g de polivinilpirrolidona (PVP), sobre los que se adicionan 12 mL de etilenglicol anhidro (Disolución I). La Disolución I se mantiene a 80°C durante 1 h. En otro matraz de fondo redondo se adiciona el precursor de oro (0.022 g de $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) con 5 mL de metanol (Disolución II). Esta disolución se agita a temperatura ambiente durante 1 h. El PVP se emplea como surfactante, de modo que impide que las Au-NPs, una vez sintetizadas, se unan entre ellas formando partículas de mayor tamaño. La función del etilenglicol es llevar a cabo la reducción del precursor de oro.

Transcurrido el periodo de tiempo, la Disolución I se enfría a 0°C en un baño de hielo y seguidamente se adiciona la Disolución II sobre la Disolución I, mientras se mantiene la agitación para conseguir una buena homogeneización. A continuación, se lleva a cabo un ajuste del pH de la disolución resultante mediante la adición de NaOH hasta alcanzar un pH comprendido entre 9 y 10 (0.5 mL de una disolución de 1 M NaOH). Esta disolución se mantiene a 80°C y agitando durante un período de 2 h, tiempo requerido para que todo el precursor de oro haya sido reducido. Posteriormente, la disolución obtenida, la cual ha experimentado un cambio

de color de amarillo a granate, se deja enfriar a temperatura ambiente, se filtra, y el sólido resultante (Au-GO) se somete a una serie de etapas de lavado con etanol. Finalmente, el material se seca en una estufa de vacío a 40°C durante 24 h y se guarda hasta su uso.

5.3.2.2. Síntesis de nanopartículas de platino

La síntesis de Pt-NPs se basa en la reducción de un precursor de platino mediante la adición de un agente reductor. En esta Tesis Doctoral, la síntesis se ha realizado sobre dos soportes carbonosos diferentes (grafito y Gr-FMN) y haciendo uso de condiciones de síntesis distintas. La síntesis de estas nanopartículas sobre ambos materiales carbonosos se ha realizado a temperatura ambiente y presión atmosférica.

5.3.2.2.1. Síntesis sobre grafito

En primer lugar, se adicionan 0.6 g de grafito en un vial conteniendo 2 mL de agua y se mantiene con agitación durante 12 h, con el fin de conseguir una buena dispersión del grafito. Transcurrido este tiempo, se adiciona el precursor de platino, el ácido hexacloroplatínico (2 mL, 30 mM H_2PtCl_6) y se sigue agitando durante 1 h. A continuación, se añade muy lentamente una disolución de tetraborohidruro de sodio (400 μL , 85 mg $\text{mL}^{-1}\text{NaBH}_4$) y se mantiene la agitación durante 2 h, tiempo necesario para que la mayor parte del precursor de platino quede reducido (Figura 2.14). Finalmente, la muestra es filtrada y sometida a un lavado con exceso de etanol, secada en una estufa a 60°C durante 30 min y guardada en un lugar fresco hasta su utilización.

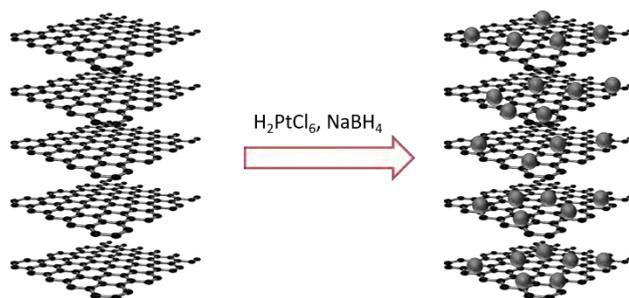


Figura 2.14. Esquema de la síntesis de Pt-NPs sobre grafito (Pt-graphite).

5.3.2.2.2. Síntesis sobre Gr-FMN

La síntesis de Pt-NPs se lleva a cabo de acuerdo al procedimiento desarrollado por Ayán-Varela et al. [21]. En primer lugar, se adicionan 9 mL de la dispersión estabilizada de Gr-FMN preparada en la sección 5.1 en un tubo de ensayo (20 mL) y se calienta a 85°C bajo agitación magnética. A continuación, se realiza la adición del precursor de platino (1 mL, 1.1 mM K_2PtCl_6), manteniéndose la agitación y la temperatura durante un total de 2 h. Transcurrido este tiempo, la disolución es enfriada a temperatura ambiente, y sometida a una etapa de centrifugación (14600 rpm, 20 min), con el objetivo de eliminar el precursor de platino que no haya reaccionado. Posteriormente, mediante sonicación, el material es dispersado de nuevo en agua ultrapura. A continuación, se adiciona el agente reductor (20 μ L, 1.5 M $NaBH_4$) y se deja reaccionar durante 45 min. Finalmente, se lleva a cabo una purificación del material preparado mediante dos etapas de centrifugación (14600 rpm, 20 min). El material purificado se dispersa en agua ultrapura (dispersión acuosa de Pt-Gr-FMN) y se guarda a una temperatura de 4°C hasta su uso. La Figura 2.15 muestra un esquema de la transformación que tiene lugar durante la síntesis.

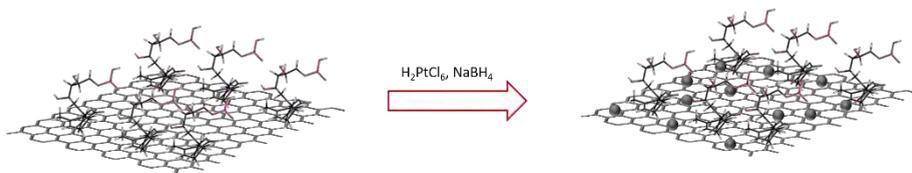
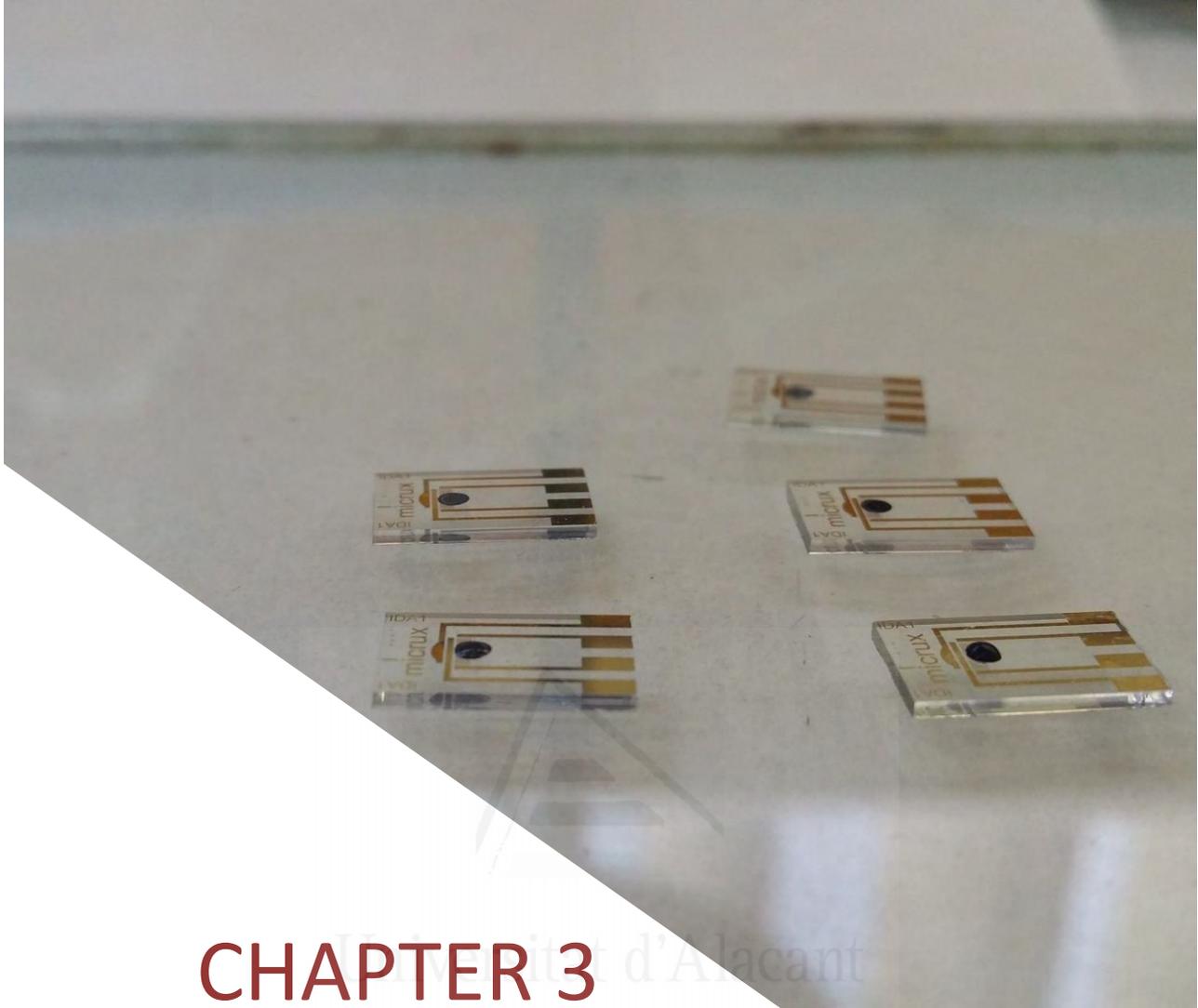


Figura 2.15. Esquema de la síntesis de Pt-NPs sobre Gr-FMN (Pt-Gr-FMN).

6. Referencias

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, 6th edition, Cengage Learning, Inc, California, 2007.
- [2] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, Chem. Soc. Rev., 39 (2010) 1747–1763.
- [3] Florinel-Gabriel Banica, Chemical sensors and biosensor. Fundamentals and applications., Wiley.
- [4] Cynthia G. Zoski, Handbook of electrochemistry, First edition, El Sevier.
- [5] Allen. J. Bard, Larry R. Faulker, Electrochemical methods. Fundamentals and applications, Second edition, Wiley.
- [6] Bradley D. Fahlman, Chapter 7: Materials characterization, in: Mater. Chem., Springer.
- [7] R.F. Egerton, Physical Principles of Electron Microscopy, Second edition, Springer.
- [8] D.B. Williams, C. Barry Carter, Transmission electron microscopy. Part 1: basis, Second Edition, Springer.
- [9] Yang Leng, Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods, 2nd Edition, Wiley.
- [10] D.M. Hércules, S.H. Hércules, J. Chem. Educ., 61 (1984) 403.
- [11] Guozhong Cao, Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, properties and applications. First edition, Imperial College Press.
- [12] V. Klang, C. Valenta, N.B. Matsko, Electron microscopy of pharmaceutical systems, Micron., 44 (2013) 45–74.
- [13] R.C. Mackenzie, Thermochim. Acta, 28 (1979) 1.
- [14] Y. Otake, R.G. Jenkins, Characterization of oxygen-containing surface complexes created on a microporous carbon by air and nitric acid treatment, Carbon, 31 (1993) 109–121.

- [15] M.C. Román-Martínez, D. Cazorla-Amorós, A. Linares-Solano, C.S.-M. de Lecea, TPD and TPR characterization of carbonaceous supports and Pt/C catalysts, *Carbon*, 31 (1993) 895–902.
- [16] H.P. Boehm, Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons, *Carbon*, 32 (1994) 759–769.
- [17] H.P. Boehm, Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment, *Carbon*, 40 (2002) 145–149.
- [18] H.F. Gorgulho, J.P. Mesquita, F. Gonçalves, M.F.R. Pereira, J.L. Figueiredo, Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption, *Carbon*, 46 (2008) 1544–1555.
- [19] Miller, J., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson, 6th edition, 2010.
- [20] *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, Eurachem., Second edition.
- [21] M. Ayán-Varela, J.I. Paredes, L. Guardia, S. Villar-Rodil, J.M. Munuera, M. Díaz-González, C. Fernández-Sánchez, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, Achieving extremely concentrated aqueous dispersions of graphene flakes and catalytically efficient graphene-metal nanoparticle hybrids with flavin mononucleotide as a high-performance stabilizer, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (2015) 10293–10307.
- [22] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS Nano.*, 4 (2010) 4806–4814.
- [23] C. González-Gaitán, R. Ruiz-Rosas, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Functionalization of carbon nanotubes using aminobenzene acids and electrochemical methods. Electroactivity for the oxygen reduction reaction, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 11242–11253.
- [24] S. Domínguez-Domínguez, J. Arias-Pardilla, Á. Berenguer-Murcia, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Electrochemical deposition of platinum nanoparticles on different carbon supports and conducting polymers, *J. Appl. Electrochem.*, 38 (2007) 259–268.



CHAPTER 3

Universitat d'Alicant
Universidad de Alicante

Flavin mononucleotide-exfoliated
graphene flakes as electrodes for the
electrochemical determination of uric acid in
the presence of ascorbic acid

1. Introduction

Uric acid (UA) is the primary end product of purine metabolism. The human normal range of UA is from 240 to 520 μM in serum and between 1.4 and 4.4 mM in urine [1–3]. In the last years the detection and quantification of UA has assumed a major role due to the fact that high levels of this analyte are related to several diseases such gout, obesity, Lesch-Nyan disease, diabetes, high cholesterol or heart diseases [4–7]. However, concentrations lower than the established minimum have been linked to Parkinson, Alzheimer or multiple sclerosis [1]. For the reasons described above, the establishment of a method to accurately determine UA levels in human physiological fluids is mandatory.

The common method employed in clinical laboratories to determine the concentration of UA in human fluids is based on the specific enzymatic oxidation of UA [2]. Other method is high performance liquid chromatography with UV absorbance detection [8]. However, the use of the electrochemical methods provides some advantages, such as short analysis time, simple experimental procedures, relatively economical instrumental requirements and high selectivity and sensitivity [2]. As a result, electrochemical techniques have been widely employed for the determination of several analytes, including AA and UA.

In spite of all the advantages described above, the most important disadvantage of the electrochemical detection and quantification of UA is its high oxidation potential that produces the interference of several compounds, obtaining an overlapped signal. Then, the development of

electrode materials with an efficient capability towards separating the oxidation peaks of UA from those of other compounds in its voltammetric determination is highly demanded. In this context, carbon materials are usually employed for electroanalysis as a result of their attractive electrochemical properties such as low residual current, readily renewable surface and wide aqueous potential window [9]. Colín-Orozco et al. [10] studied the electrochemical behavior of UA, dopamine (DP) and AA by CV and differential pulse voltammetry (DPV) in a 0.1 M NaCl aqueous solution and by using a bare carbon paste electrode (CPE), achieving by DPV a suitable sensitivity ($(23.79 \pm 0.05) \mu\text{A mM}^{-1}$) and low LOQ of $(18.18 \pm 0.05) \mu\text{M}$ for UA quantification. However, the electrochemical study performed by Colín-Orozco et al. is done in media where UA, DA and AA are not mixed [10], and the simultaneous detection of UA in the presence of AA has not been studied. Actually, the direct electrochemical detection of UA in the presence of other species (e.g., xanthine and hypoxanthine) using a GC electrode has been reported by other groups [11]. However, when AA is in the sample, the electrochemical detection of UA is not possible, due to the adsorption of the AA oxidation product on the GC electrode surface, resulting in an unusable electrode [12]. Therefore, several modified GC electrodes [13] and the use of other carbon materials have been proposed for this application [14–16].

Among carbon nanomaterials, graphene has acquired an important role as a material for electrochemical sensing [9,17], due to its unique properties including fast electron transport, high thermal conductivity, mechanical flexibility and good biocompatibility [9]. Furthermore, single-layer graphene

has a high surface area (theoretically $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [17], which makes it ideal as a support material, and also the presence of defects that can act as electroactive sites [18]. Several papers have been found in the literature where graphene or graphene-related materials have been employed for the development of electrochemical sensors. For instance, Shang et al. [19] use multilayer graphene nanoflake films for the simultaneous detection of UA, AA and DP, achieving a great separation of the signals obtained by CV. Sun et al. [20] have developed a UA sensor based on GO modified with thionine, obtaining a low LOD of $7 \text{ }\mu\text{M}$ without any interference from AA and DP. However, in the cases described above, the material preparation was tedious and the use of uricase enzyme was necessary, resulting in an increase in the total cost of the sensor. Other references related to UA quantification by voltammetric detection have been found in the literature, showing linear ranges usually found in biological fluids. However, the sensitivity achieved in these works is lower than the desirable [3,21–23]. In order to increase the sensitivity, metal nanoparticles are used. Then, Pt-NPs supported on a graphene material should be a suitable strategy to reduce costs while maintaining the electrocatalytic activity of Pt [24]. In addition, another drawback that needs to be solved is the use of organic solvents for the dispersion of the electrode material, especially graphene. Aqueous suspensions of high concentrations of graphene flakes for the preparation/modification of electrodes are desirable; however, due to the hydrophobic properties of graphene these dispersions are difficult to prepare. Then, the dispersants should fulfil some requirements to be employed: 1) they should lead to very high concentrations of colloidal

stabilized graphene sheets. 2) The amount of dispersant has to be very low and 3) they should be innocuous and nontoxic [25]. Regarding these points, Ayán-Varela et al. [25] have very recently developed a method to prepare stable aqueous graphene dispersions using the sodium salt of flavin mononucleotide (FMN), achieving extremely concentrated dispersions of high quality graphene flakes. These dispersions have been used in the preparation of supported metallic nanoparticles (Pt, Pd, Ag) [25].

Based on the work above, taking advantage of the attractive properties of graphene and using the method developed to prepare highly concentrated aqueous dispersions of graphene, in this work graphene-modified arrays of gold interdigitated microelectrodes are presented for UA voltammetric detection in the presence of AA. The Au-IDA has been modified with FMN-stabilized graphene dispersion (Gr-FMN) and with Pt-NPs on FMN-stabilized graphene dispersion (Pt-Gr-FMN). To our knowledge, this is the first time that these modified electrodes have been used for this purpose.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipment

Uric acid ($\geq 99\%$, crystalline) and L-ascorbic acid (reagent grade, crystalline) standard chemicals were provided by Sigma-Aldrich. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) obtained from Emsure[®] and Sigma-Aldrich, respectively, were used to prepare phosphate buffer solution (PBS, 0.25 M, pH 7.0). Sulphuric acid (H_2SO_4 , 98%) was provided by AnalaR Normapur[®] and sodium hydroxide

(NaOH) from Merck. All the solutions were prepared with 18.2 M Ω cm ultrapure water obtained from an Elga Labwater Purelab system.

Graphene flakes exfoliated and stabilized with flavin mononucleotide (Gr-FMN) and Gr-FMN hybridized with Pt-NPs (Pt-Gr-FMN) were prepared according to the procedure described in the literature [25].

Transmission electron microscopy (TEM) imaging was carried out using a JEOL TEM, JEM-2010 microscope, which was furnished with an Oxford X-ray detector (EDX) (INCA Energy TEM 100 model), and GATAN acquisition camera (ORIOUS SC600).

2.2. Preparation of graphene modified electrodes

Thin-film interdigitated array microelectrodes of gold (Au-IDA, Micrux Technologies) have been used as support electrodes. The following procedure has been implemented for the preparation of the graphene-modified electrodes. Firstly, the Au-IDA was cleaned by CV performing ten cycles between -1.5 and 1.5 V vs gold pseudo-reference at 0.1 V s⁻¹ in 0.05 M H₂SO₄. Then, the Au-IDA was modified by drop casting a given graphene dispersion. The concentration was 0.188 mg mL⁻¹ and 0.116 mg mL⁻¹ for Gr-FMN and Pt-Gr-FMN dispersions, respectively. The weight of the deposited graphene or Pt-graphene hybrid was 2.35 μ g for all the electrodes. The method for the deposition was the addition of a defined number of 0.5 μ L drops (25 and 40 drops for Gr-FMN and Pt-Gr-FMN dispersions, respectively), which were allowed to dry with the use of an infrared lamp. Two different electrodes were prepared, one of them modified with Gr-FMN (Gr-FMN/Au-IDA) and the other one modified with Pt-Gr-FMN (Pt-Gr-

FMN/Au-IDA). Finally, the electrodes were stored in PBS at room temperature until their use.

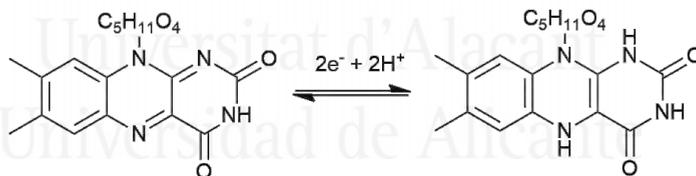
2.3. Electrochemical methods

All electrochemical measurements were carried out with a CV set-up (EDAQ EA 163 Model potentiostat, EG&G PARC model 175 Universal Programmer and e-corder EDAQ 410). A three-electrode configuration has been used, with the modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA) acting as the WE, a reversible hydrogen electrode (RHE) immersed in the same electrolyte as a RE and a Au wire as a CE. The electrochemical cell, was completely deoxygenated during the measurements by nitrogen bubbling. The calibration curves have been obtained by adding several aliquots from a concentrated stock solution of 100 mM UA in PBS with a pH higher than 8.4 until reaching the desired concentration, between 60 and 578 μM . When the interference of AA was studied, a fixed AA concentration of 250 μM was added to the electrochemical cell and the same UA concentration range has been studied. All measurements were carried out in PBS (37 mL, 0.25 M, pH 7.0) and by triplicate in order to determine analytical parameters. For all replicates, one modified electrode was used, and new AA and UA solutions were prepared for each replicate.

3. Results and discussion

3.1. Modified electrode characterization

The electrochemical behavior of the modified electrodes was investigated in the electrolyte in the absence of UA by CV. Figure 3.1 shows the voltammograms for Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes in PBS. For Gr-FMN/Au-IDA (Figure 3.1A), the voltammograms exhibit different redox processes; two overlapped at around 0.07 V and 0.17 V and a third one at 0.3 V during the positive going sweep. During the reverse scan, three reduction peaks are clearly observed. It is widely accepted that, in aqueous media, the fully oxidized Flavin (FMN) in solution is reduced to Flavin-hydroquinone (FMNH₂) in “one-step” in a 2e⁻/2H⁺ reduction [26]. These processes occur at around -0.4 V vs Ag/AgCl, being the peaks called B-B’ related to these faradaic reactions [27] (Scheme 3.1).



Scheme 3.1. Electrochemical reactions of Flavin mononucleotide (FMN).

However, it has been reported that in neutral and weak basic media the oxidation of the Flavin-quinone to Flavin-hydroquinone goes through the formation of an intermediate (radical semi-quinone), leading two different signals overlapped [28]. In our case, the redox processes are related to the adsorbed FMN because the peak current increases linearly with the scan rate [25]. The presence of oxidized, semiquinone, and reduced forms of

riboflavin has been studied using surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS) coupled to electrochemical techniques [29]. Then, the immobilization of FMN on the graphene layers could stabilize the intermediate semiquinone during the oxidation process observing two clearly peaks in the voltammogram. Then, we proposed that FMN adsorbed on the graphene surface undergoes two-step reduction, being the overlapped signals called A-A' and B-B' related to the reduction/oxidation of FMN to Flavin-hydroquinone. Finally, the redox processes C-C' are more difficult to assign and it could be consequence of some impurity belonging to Flavin family (due to purity of FMN employed is between 73 and 79%).

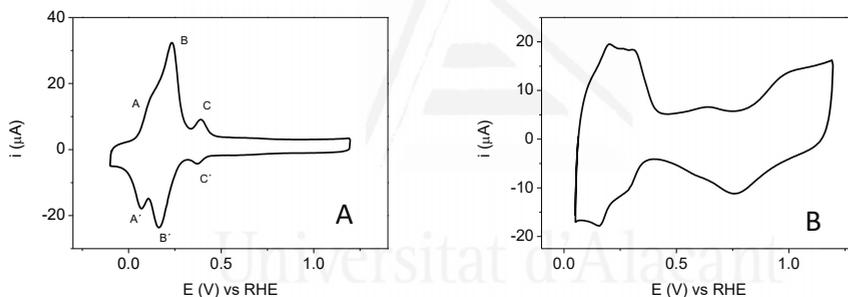


Figure 3.1. Steady state voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for: A) Gr-FMN/Au-IDA electrode. B) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode. $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$.

The voltammogram obtained with Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode (Figure 3.1B) shows the characteristic profile of Pt, the region between 0.05 and 0.4 V corresponds to the so-called adsorption-desorption of hydrogen and anions on the Pt surface, where the redox processes of FMN are also overlapped. The zone between 0.5 and 1.2 V corresponds to the oxidation-reduction of the Pt surface. Moreover, an oxidation peak is clearly observed at around 0.65 V that can be attributed to some oxygen surface groups present in the graphene layers.

Figure 3.2 and Figure 3.3 show the TEM images of Gr-FMN and Pt-Gr-FMN dispersions, respectively. It can be seen from Figure 3.2 the expected lamellar nature of the exfoliated graphene sheets. The number of monolayers in each flake obtained with this method (exfoliation and stabilization of graphite using FMN) is between one and five [25].

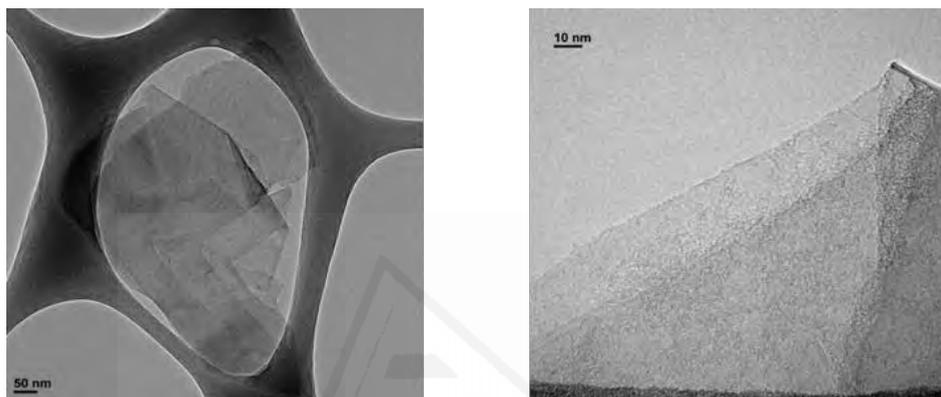


Figure 3.2. TEM images of Gr-FMN flakes at different magnifications (A-B).

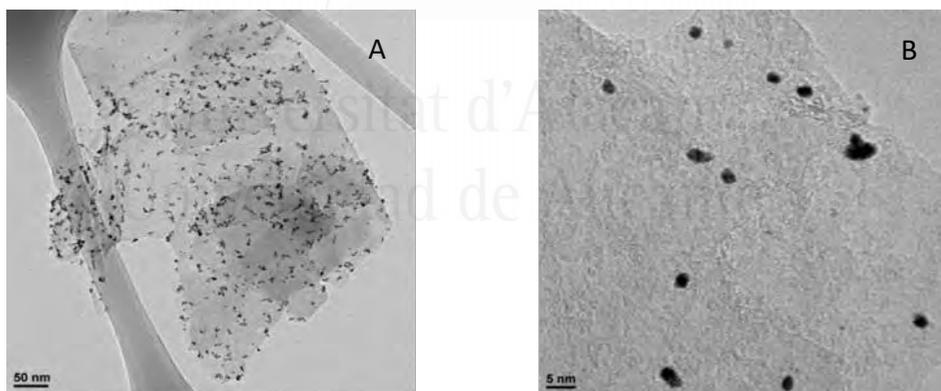


Figure 3.3. TEM images of Pt-Gr-FMN hybrids at different magnifications (A-B).

Figure 3.3 shows a homogeneous distribution of Pt-NPs on the graphene layers, with nanoparticle sizes typically between 3 and 6 nm (Figure 3.3B). The amount of Pt on graphene was determined by EDX, resulting in a (2.52 ± 0.52) wt%.

3.2. Electrochemical behavior of AA and UA

The electrochemical behavior of UA on a bare electrode (Au-IDA) and both modified electrodes has been studied by CV. The Gr-FMN/Au-IDA electrode has been investigated in the potential range in which the redox processes of FMN are not observed. Figure 3.4 shows the voltammograms obtained during the oxidation of different concentrations of UA on the different electrodes.

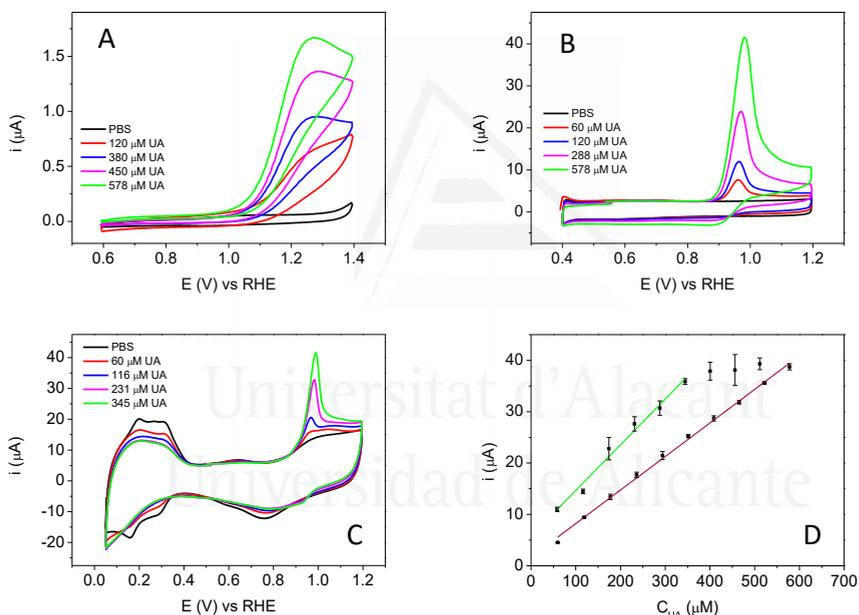


Figure 3.4. Voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for successive additions of UA (A-C): A) bare Au-IDA (black line: 0 μM ; red: 120 μM ; blue: 380 μM ; pink: 450 μM ; green: 578 μM). B) Gr-FMN/Au-IDA electrode (black line: 0 μM ; red: 60 μM ; blue: 120 μM ; pink: 288 μM ; green: 578 μM). C) Pt/Gr-FMN/Au-IDA electrode (black line: 0 μM ; red: 60 μM ; blue: 116 μM ; pink: 231 μM ; green: 345 μM). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) Calibration curve for UA quantification in the absence of AA obtained with Gr-FMN/Au-IDA electrode (maroon line) and with Pt-Gr-FMNS/Au-IDA electrode (green line).

Figure 3.4A exhibits the UA oxidation on a bare electrode (Au-IDA), showing an oxidation current at 1.25 V. Figure 3.4B and Figure 3.4C display the oxidation of UA for Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes, respectively. As it can be seen in Figure 3.4B and Figure 3.4C, for both electrodes, the oxidation peak related to UA oxidation appears at 0.99 V, providing higher oxidation currents than with the bare electrode.

According to the results obtained, both modified electrodes with Gr-FMN and Pt-Gr-FMN dispersions show an electrocatalytic effect because the oxidation potential decreases and the current increases in comparison to the bare electrode for similar concentrations. In addition, the presence of Pt on graphene also enhances the results obtained with Gr-FMN/Au-IDA (Figure 3.4B and Figure 3.4C) providing higher current intensities than Gr-FMN/Au-IDA electrode.

Then, the calibration curves for UA oxidation have been obtained with these two modified electrodes (Figure 3.4D). All voltammograms have been obtained by triplicate. The oxidation current of UA (i_{UA}) is linear in the UA concentration range between 0 and 578 μM for Gr-FMN/Au-IDA electrode and between 0 and 345 μM for Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode, with LODs of 18 μM with both electrodes.

The regression models obtained for Gr-FMN/Au-IDA (Equation 3.1) and Pt-Gr-FMN/Au-IDA (Equation 3.2) electrodes are the following:

$$i_{UA} (\mu\text{A}) = (0.065 \pm 0.003) C_{UA} (\mu\text{M}) + (1.7 \pm 1.0); \quad \text{Equation 3.1}$$

$$r = 0.999 (N = 10)$$

$$i_{UA} (\mu\text{A}) = (0.10 \pm 0.02) C_{UA} (\mu\text{M}) + (6 \pm 4); \quad \text{Equation 3.2}$$

$$r = 0.992 (N = 6)$$

Results obtained with both modified electrodes are outlined in Table 3.1. It can be observed that the linear range for the Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode is shorter than the one obtained in the absence of Pt-NPs (Figure 3.4D, Table 3.1). This result can be ascribed to the fact that the surface active sites on the Pt-NPs are approaching full saturation with UA molecules or the products of their oxidation at the higher UA concentrations tested. The blockage of the Pt surface can be observed in the voltammetric profile, in which the charge of the so-called hydrogen adsorption-desorption zone (between 0.0 and 0.4 V) decreases when the UA concentration increases (Figure 3.4C). When the UA concentration is higher than 345 μM , it can be considered that all active sites are blocked, and consequently, the oxidation current remains constant with UA concentration.

The LOD was determined empirically, measuring progressively more diluted concentrations of the analyte. The LOD was the lowest concentration whose signal could be clearly distinguished from the blank. Moreover, the LOQ was calculated as 3.3 times LOD ($\text{LOQ} = 3.3\text{LOD}$). On the other hand, the RSD values were obtained for 3 replicates at 177 μM concentration level of UA. Table 3.1 exhibits how the presence of Pt-NPs provides an enhanced sensitivity as a consequence of the electroactivity of Pt towards UA oxidation; however, the linear range decreases in relation to the Gr-FMN/Au-IDA electrode. The linear ranges obtained allow the developed sensor to measure UA levels in serum or urine fluids.

Table 3.1. Analytical parameters obtained for UA quantification with both modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA).

Parameter	Electrode	
	Gr-FMN/Au-IDA	Pt-Gr-FMN/Au-IDA
Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.065 ± 0.003	0.10 ± 0.02
Intercept (μA)	1.7 ± 1.0	6 ± 4
r	0.999	0.992
N	10	6
Linear range (μM)	0-578	0-345
LOD (μM)	18	18
LOQ (μM)	60	60
RSD (%)	4	8
(n = 3; 177 μM)		

In order to identify the voltammetric peaks belonging to the AA oxidation, electrochemical behavior of the bare (Au-IDA) and modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA) towards the oxidation of AA in the absence of UA was investigated by CV.

Figure 3.5A shows the voltammograms obtained with a bare Au-IDA electrode in PBS and for successive additions of AA to obtain the different concentrations indicated in the figure.

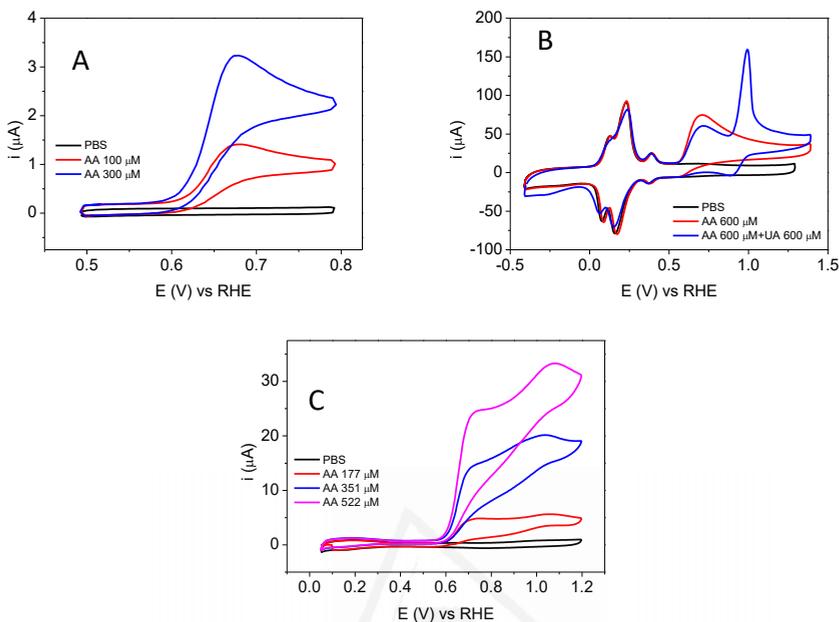


Figure 3.5. Voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) for successive additions of AA (A-C): A) bare Au-IDA (black line: 0 μM ; red: 100 μM ; blue: 300 μM). B) Gr-FMN/Au-IDA electrode (black line: 0 μM ; red: 600 μM ; blue: AA 600 μM + UA 600 μM). C) Pt/Gr-FMN/Au-IDA electrode (black line: 0 μM ; red: 177 μM ; blue: 351 μM ; pink: 522 μM). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$.

As it can be seen an anodic signal appears at 0.67 V belonging to the oxidation of AA. No cathodic signal can be observed in the reverse scan due to the irreversibility of this oxidation.

Figure 3.5B exhibits the voltammograms obtained with the Gr-FMN/Au-IDA in PBS (black line), AA solution (red line) and in a mixture of AA and UA (blue line). Two different oxidation peaks belonging to AA and UA, at potentials at around 0.7 V and 0.99 V respectively, can be clearly observed.

Figure 3.5C shows the voltammetric behavior of Pt-Gr-FMN/Au-IDA towards successive additions of AA, which present two anodic peaks at around

0.74 V and 1.1 V. Then, this second peak could interfere in the determination of UA.

3.3. Electrochemical determination of UA in the presence of AA

Possible AA interference was investigated by CV using a concentration 3 times higher than the normal AA levels in serum [30]. The concentration ratio between AA and UA ensure the selectivity of the method towards UA quantification (Figure 3.6). Figure 3.6A displays the voltammogram obtained for a bare electrode (Au-IDA) in which two oxidation peaks are clearly observed, the first one corresponding to AA oxidation at 1.07 V and the second one at 1.28 V corresponding to UA oxidation. Then, it can be concluded that with this electrode is not possible to separate the oxidation of both compounds. Figure 3.6B and Figure 3.6C exhibit the voltammograms obtained for the Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes respectively at different concentrations of UA in the presence of 250 μ M AA. Figure 3.6B shows the behavior of Gr-FMN/Au-IDA electrode, the voltammograms show an oxidation peak at 0.74 V that corresponds to AA oxidation, while the oxidation peak corresponding to UA is maintained at 0.99 V, the same potential than the observed in the absence of AA. Figure 3.6C exhibits the voltammograms for Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode obtained for successive additions of UA in a 250 μ M AA solution. It can be observed in all the voltammograms an oxidation peak corresponding to AA at 0.70 V and the UA oxidation peak at 0.99 V.

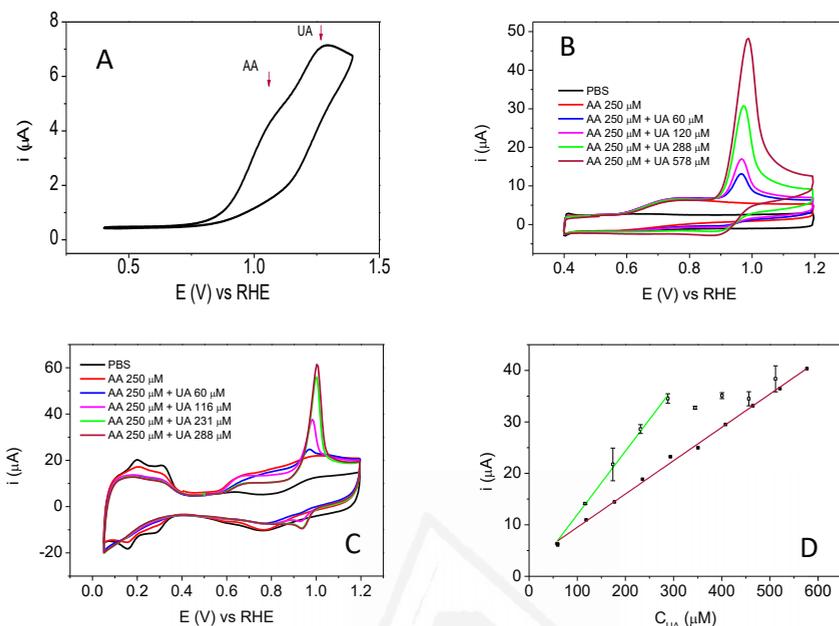


Figure 3.6. Voltammograms obtained for: A) bare Au-IDA electrode in 3 mM AA and 87 μM UA solutions in PBS. B) Gr-FMN/Au-IDA electrode in 250 μM AA solution in PBS for successive additions of UA (red line: 0 μM; blue: 60 μM; pink: 120 μM; green: 288 μM; maroon: 578 μM). C) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode in 250 μM AA solution in PBS for successive additions of UA (red line: 0 μM; blue: 60 μM; pink: 116 μM; green: 231 μM; maroon: 288 μM). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) Calibration curve for UA quantification in the absence of AA obtained with Gr-FMN/Au-IDA electrode (maroon line) and with Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode (green line).

The comparison of the results obtained with modified and non-modified electrodes exhibits that the modified electrodes show lower oxidation potentials and higher oxidation currents than the bare electrode for both analytes. Moreover, a larger separation of the oxidation peaks is observed that could improve the resolution of the determination method. The successful separation of the signals related to the oxidation of AA and UA is thanks to graphene properties, which offer several advantages for electrochemical sensing applications. Some authors claim that the larger decrease in the oxidation overpotential for AA is probably caused by the

interaction between AA and graphene surface, which may accelerate the electron transfer on the modified electrodes. On the other hand, the enhancement in current response may be attributed to the increase of the electrode surface [31]. Moreover, the presence of Pt-NPs on graphene support also produces a slight improvement, showing high currents for lower UA concentrations, due to the high electroactivity of Pt towards several reactions. Moreover, the surface of the electrode contains FMN molecules that have been used as intermediates by accepting electrons from many functional groups and donating electrons to other molecules [26-28]. Then, FMN can act as mediator of the oxidation of these compounds producing some interactions between the analytes and the surface.

In addition, voltammetric studies for the dependence of the current of AA and UA with the scan rate were performed by using a Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode, whose results for both analytes show the typical behavior of a process where the reactant is in the solution (results not shown).

The calibration curves obtained in the presence of AA are also shown in Figure 3.6D. It can be observed that the UA oxidation current in the presence of AA (250 μM) is linear in the concentration range between 0 and 578 μM with Gr-FMN/Au-IDA and in the range from 0 to 288 μM for Pt-Gr-FMN/Au-IDA. The following linear relations have been calculated for Gr-FMN/Au-IDA (Equation 3.3) and Pt-Gr-FMN/Au-IDA (Equation 3.4):

$$i_{\text{UA}} (\mu\text{A}) = (0.065 \pm 0.003) C_{\text{UA}} (\mu\text{M}) + (3.0 \pm 1.0); \quad \text{Equation 3.3}$$

$$r = 0.999 \text{ (N = 10)}$$

$$i_{\text{UA}} (\mu\text{A}) = (0.123 \pm 0.010) C_{\text{UA}} (\mu\text{M}) + (1.7 \pm 1.0); \quad \text{Equation 3.4}$$

$$r = 0.999 \text{ (N = 5)}$$

Table 3.2 summarizes the results obtained for Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes in the presence of AA. The measurements obtained with Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode show higher sensitivity than that of the electrode without Pt-NPs. However, its linear range is shorter, similar to the case without AA, which is due probably again to the saturation of the surface active sites on the metal nanoparticles. Also, the current associated with hydrogen adsorption and desorption (between 0.0 and 0.4 V) decreases when the UA concentration increases.

Table 3.2. Analytical parameters obtained for UA quantification in the presence of AA (250 μM) with the two modified electrodes (Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA).

Parameter	Electrode	
	Gr-FMN/Au-IDA	Pt-Gr-FMNAu-IDA
Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.065 ± 0.003	0.123 ± 0.010
Intercept (μA)	3.0 ± 1.0	-0 ± 2
r	0.999	0.999
N	10	5
Linear range (μM)	0-578	0-288
LOD (μM)	18	18
LOQ (μM)	60	60
RSD (%)	8	14
(n = 3; 177 μM)		

Comparing the results of Table 3.1 and Table 3.2, it can be concluded that the linearity range decreases ($C_{\text{UA}} = 288 \mu\text{M}$) when AA is in the solution and for the Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode. These results could be as consequence

of the blockage of the active sites of Pt surface, which is produced at lower UA concentrations because both AA and UA are adsorbed on the Pt surface. Therefore, for 250 μM AA, the intensity of the oxidation peak for UA does not change when the concentration increases from 288 μM UA for Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode.

If the values obtained for the sensitivity with and without AA are compared, no significant differences are observed for Gr-FMN/Au-IDA electrode, and only a slight increase of the slope for Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode ($(0.10 \pm 0.02) \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ (without AA) vs $0.123 \pm 0.010 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ (with AA)) is obtained. Finally, in order to assess whether AA interferes in the UA measurements, that is, whether the results obtained in the presence of AA in the solution are the same as without AA, a statistical test was applied. It involves plotting the results of the measurement of UA without AA in one of the axis (Y axis), and the results obtained with AA in the other axis (X-axis), for the same electrode. If the results obtained with and without AA are the same, a straight line with a slope amounting to one and crossing the origin (intercept zero) will be obtained [32].

Figure 3.7 shows the plots obtained from the results for the UA oxidation with and without AA for the Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes. The plot obtained for Gr-FMN/Au-IDA electrode (Figure 3.7A) shows a good correlation between both results in the presence and absence of AA. The linear equation obtained is (Equation 3.5):

$$i_{\text{UA}} (\mu\text{A}) = (0.99 \pm 0.04) i_{\text{UA+AA}} (\mu\text{A}) - (0.8 \pm 0.9) \quad \text{Equation 3.5}$$

with a correlation coefficient of 0.999. Then, it can be concluded that AA does not interfere in the UA quantification using the Gr-FMN/Au-IDA electrode.

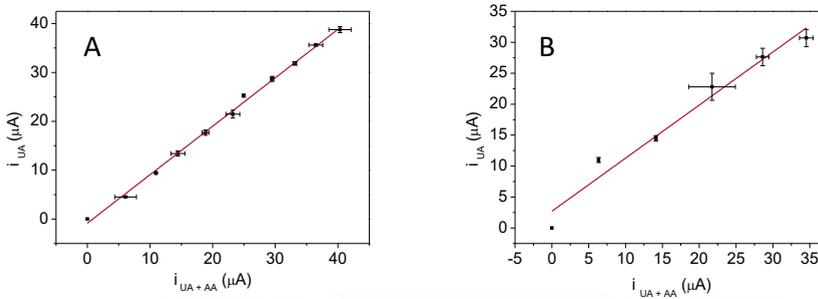


Figure 3.7. Regression lines of i_{UA} vs i_{UA+AA} : A) Gr-FMN/Au-IDA electrode. B) Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode. Error bars are represented by the standard deviation obtained with three replicates.

Figure 3.7B shows the correlation obtained for Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode with and without AA. The linear relationship obtained is shown in Equation 3.6:

$$i_{UA} (\mu A) = (0.8 \pm 0.2) i_{UA+AA} (\mu A) + (4 \pm 4) \quad \text{Equation 3.6}$$

with a correlation coefficient of 0.984. In this case, the correlation is lower than with the other electrode, but it can be concluded that AA does not significantly interfere in the UA quantification using the Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode. However, if the results obtained for Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrodes are compared, several differences can be noticed. The correlation coefficient is much higher for the Gr-FMN/Au-IDA electrode, indicating that the results obtained with and without AA are more similar with this electrode. However, the sensitivity obtained with Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode is twice the value obtained without Pt, then, this Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode provides the most auspicious results that can be

ascribed to the synergistic effect between the high conductivity and large surface area of graphene and the high catalytic activity of Pt-NPs.

Table 3.3 shows a comparison of some analytical parameters obtained in this work, with others obtained from the literature.

Table 3.3. Comparison of analytical parameters for several electrochemical UA sensors by voltammetric detection.

Electrode	Method	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)	Linear Range (μM)	Ref.
MBI-Au	CV	0.0152 ± 0.0005	1	1-300	[3]
Bare CPE	DPV	0.0238	5.63	0-100	[10]
Ag-PPy/GCE	DPV	0.1818	0.5	2-100	[21]
GCE-CoPc/MWCNT	CV	0.02	260	260-4000	[22]
AuNPs-MWCNTs/GC	DPV	0.037	2	4-300	[23]
MoS ₂ /rGO	DPV	0.141	0.46	1.38-745	[33]
AuNPs _(EDAS) -rGO	CV	0.008	0.5	0.5-50	[34]
Pt-Gr-FMN/Au-IDA	CV	0.123 ± 0.010	18	60-284	This work
Gr-FMN/Au-IDA	CV	0.065 ± 0.003	18	60-578	This work

It can be observed that the proposed material electrode is competitive, representing therefore a good and interesting alternative for sensor

applications. In addition, no sensors based in CV detection with sensitivity higher than the one reached in the present work were found in literature. Finally, the lifetime of the electrodes is dependent of the Gr-FMN and Pt-Gr-FMN dispersions, which are stable for at least six months [25]. After this time, the FMN is photosensitive suffering degradation. Then, it can be considered that the lifetime of the electrodes is around six months.

4. Conclusions

Graphene flakes exfoliated using flavin mononucleotide and Pt-NPs supported on graphene flakes have been electrochemically characterized by CV. The dispersions of these materials have been used in the modification of gold interdigitated microelectrodes. An electrochemical method has been developed for the quantification of UA in the presence of AA by CV. The analyses have been carried out in PBS to simulate physiological human fluids (PBS, 0.25 M, pH 7.0). Two different modified electrodes have been studied: Gr-FMN/Au-IDA and Pt-Gr-FMN/Au-IDA. The Gr-FMN/Au-IDA electrode exhibits a linear range of the UA oxidation current with the UA concentration being between 0 and 578 μM , achieving a LOD of 18 μM . When AA is in the UA solution, these values remain constant for this electrode. For the Pt-Gr-FMN/Au-IDA electrode, the linearity range obtained for the UA oxidation current with the concentration is not as good as with the Gr-FMN/Au-IDA electrode due to the adsorption of UA and AA on the Pt surface, resulting in a shorter linear range (between 0 and 288 μM). Even though the Gr-FMN/Au-IDA electrode offers a larger linear range, the presence of Pt-NPs has its own advantages, including a higher sensitivity

($0.123 \pm 0.010 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$) that is approximately twice the sensitivity value of the Gr-FMN/Au-IDA electrode. As a consequence of the analytical figures of merit obtained in this work, the developed graphene based-materials become an alternative to develop electrochemical sensors, able to measure UA levels in some physiological fluids.

5. References

- [1] M.K. Kutzing, B.L. Firestein, Altered uric acid levels and disease states, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (2008) 1–7.
- [2] D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, P.S. Sharma, B.B. Prasad, Electrochemical detection of uric acid in mixed and clinical samples: a review, *Electroanalysis*, 23 (2011) 305–320.
- [3] C. Retna Raj, T. Ohsaka, Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol, *J. Electroanal. Chem.*, 540 (2003) 69–77.
- [4] T.R. Merriman, H.K. Choi, N. Dalbeth, The genetic basis of gout, *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, 40 (2014) 279–290.
- [5] Q. Lv, X.-F. Meng, F.-F. He, S. Chen, H. Su, J. Xiong, P. Gao, X.-J. Tian, J.-S. Liu, Z.-H. Zhu, K. Huang, C. Zhang, High serum uric acid and increased risk of type 2 diabetes: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies, *PLOS ONE*, 8 (2013) e56864.
- [6] A. So, B. Thorens, Uric acid transport and disease, *J. Clin. Invest.*, 120 (2010) 1791–1799.
- [7] M. Alderman, K.J.V. Aiyer, Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan, *Curr. Med. Res. Opin.*, 20 (2004) 369–379.
- [8] D. Remane, S. Grunwald, H. Hoeke, A. Mueller, S. Roeder, M. von Bergen, D.K. Wissenbach, Validation of a multi-analyte HPLC-DAD method for determination of uric acid, creatinine, homovanillic acid, niacinamide, hippuric acid, indole-3-acetic acid and 2-methylhippuric acid in human urine, *J. Chromatogr. B*, 998–999 (2015) 40–44.
- [9] A.T. Lawal, Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors, *Talanta*, 131 (2015) 424–443.

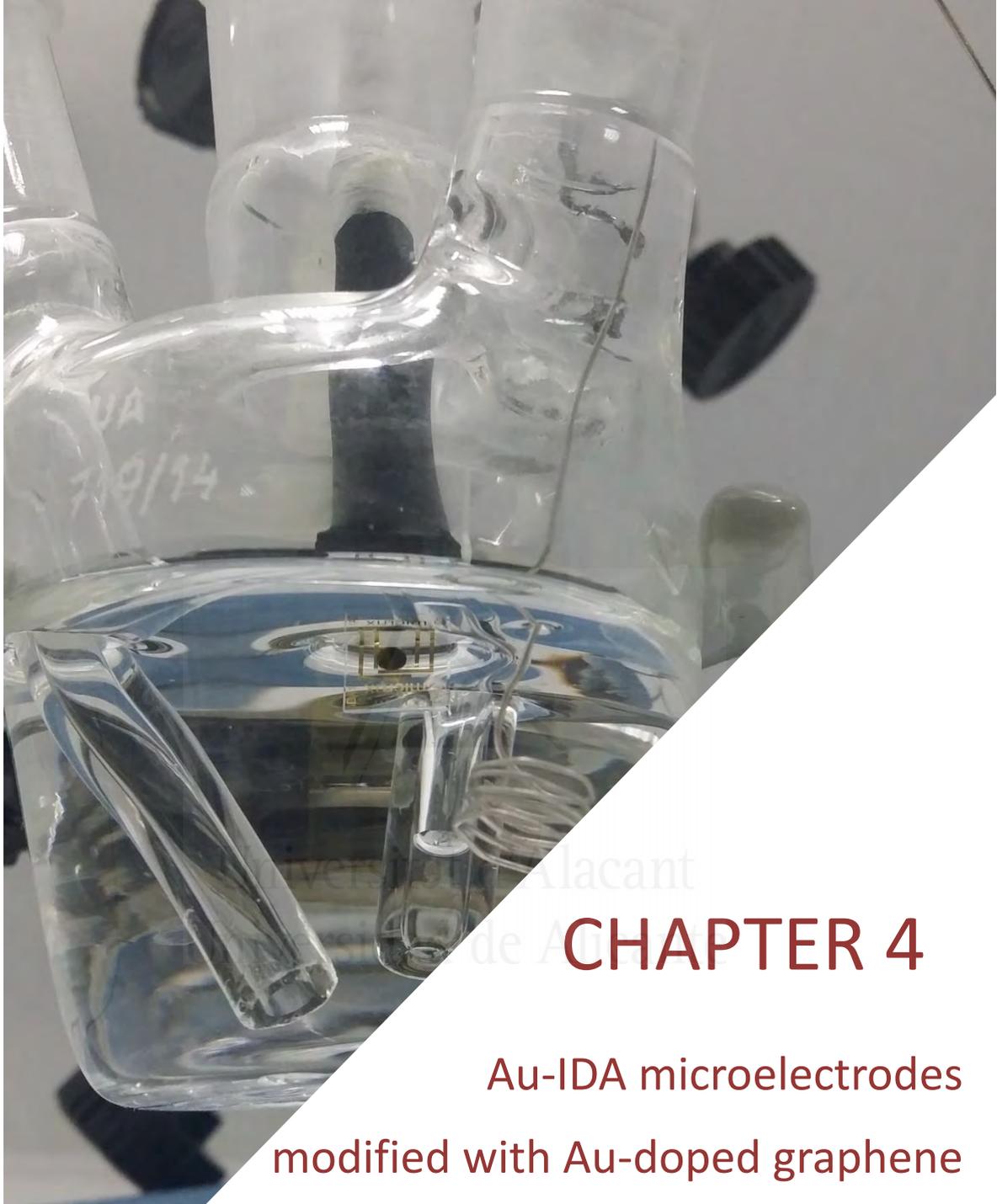
- [10] E. Colín-Orozco, S. Corona-Avendaño, M.T. Ramírez-Silva, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, On the electrochemical oxidation of dopamine, ascorbic acid and uric acid onto a bare carbon paste electrode from a 0.1 M NaCl aqueous solution at pH 7, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012) 6097–6105.
- [11] T. Yao, Y. Taniguchi, T. Wasa, S. Musha, Anodic voltammetry and its analytical application to the detection and simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51 (1978) 2937–2941.
- [12] S.A. John, Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrodes in acetate buffer solution, *J. Electroanal. Chem.*, 579 (2005) 249–256.
- [13] L. Zhang, X. Jiang, Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine, *J. Electroanal. Chem.*, 583 (2005) 292–299.
- [14] J. Huang, Y. Liu, H. Hou, T. You, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 632–637.
- [15] S. Wei, F. Zhao, B. Zeng, Electrochemical behavior and determination of uric acid at single-walled carbon nanotube modified gold electrodes, *Microchim. Acta*, 150 (2005) 219–224.
- [16] S. Qi, B. Zhao, H. Tang, X. Jiang, Determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by a novel electrochemical sensor based on pristine graphene, *Electrochimica Acta*, 161 (2015) 395–402.
- [17] M. Pumera, Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage, *Chem. Rec.*, 9 (2009) 211–223.
- [18] M. Pumera, Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 4146–4157.
- [19] N.G. Shang, P. Papakonstantinou, M. McMullan, M. Chu, A. Stamboulis, A. Potenza, S.S. Dhesi, H. Marchetto, Catalyst-free efficient growth, orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes, *Adv. Funct. Mater.*, 18 (2008) 3506–3514.
- [20] Z. Sun, H. Fu, L. Deng, J. Wang, Redox-active thionine–graphene oxide hybrid nanosheet: One-pot, rapid synthesis, and application as a sensing platform for uric acid, *Anal. Chim. Acta*, 761 (2013) 84–91.

- [21] K. Ghanbari, N. Hajheidari, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using silver nanoparticles deposited on polypyrrole nanofibers, *J. Polym. Res.*, 22 (2015) 1–9.
- [22] J. de Fátima Giarola, A. César Pereira, Development and application of a sensor based on carbonaceous materials and cobalt phthalocyanine composite for electrochemical determination of uric acid, *Electroanalysis*, 28 (2016) 1348–1355.
- [23] Y. Pan, Y. Li, J. Jia, H. Chen, Selective determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using layer-by-layer gold nanoparticles, tin oxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes assembled multilayer films, *Electrochemistry*, 83 (2015) 956–961.
- [24] H. Zhang, X. Bo, L. Guo, Electrochemical preparation of Pt nanoparticles supported on porous graphene with ionic liquids: Electrocatalyst for both methanol oxidation and H₂O₂ reduction, *Electrochimica Acta*, 201 (2016) 117–124.
- [25] M. Ayán-Varela, J.I. Paredes, L. Guardia, S. Villar-Rodil, J.M. Munuera, M. Díaz-González, C. Fernández-Sánchez, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, Achieving extremely concentrated aqueous dispersions of graphene flakes and catalytically efficient graphene-metal nanoparticle hybrids with flavin mononucleotide as a high-performance stabilizer, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (2015) 10293–10307.
- [26] S.L.J. Tan, R.D. Webster, Electrochemically induced chemically reversible proton-coupled electron transfer reactions of riboflavin (vitamin B₂), *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5954–5964.
- [27] M. Roushani, Z. Abdi, Novel electrochemical sensor based on graphene quantum dots/riboflavin nanocomposite for the detection of persulfate, *Sens. Actuators B Chem.*, 201 (2014) 503–510.
- [28] O.S. Ksenzhek, S.A. Petrova, Electrochemical properties of flavins in aqueous solutions, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11 (1983) 105–127.
- [29] M.R. Bailey, Z.D. Schultz, SERS speciation of the electrochemical oxidation–reduction of riboflavin, *Analyt.*, 141 (2016) 5078–5087.
- [30] A.A. Fowler, A.A. Syed, S. Knowlson, R. Sculthorpe, D. Farthing, C. DeWilde, C.A. Farthing, T.L. Larus, E. Martin, D.F. Brophy, S. Gupta, Medical Respiratory Intensive Care Unit Nursing, B.J. Fisher, R. Natarajan, Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis, *J. Transl. Med.*, 12 (2014) 32.

- [31] D.-F. Han, C.-S. Shan, L.-P. Guo, L. Niu, D.-X. Han, Electro-oxidation of ascorbic acid on PVP-stabilized graphene electrode, *Chem. Res. Chin. Univ.*, 26 (2010) 287–290.
- [32] Miller, J., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th edition, Pearson, 2010.
- [33] L. Xing, Z. Ma, A glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of MoS₂, *Microchim. Acta*, 183 (2015) 257–263.
- [34] V. Vinoth, J.J. Wu, S. Anandan, Sensitive electrochemical determination of dopamine and uric acid using AuNPs(EDAS)–rGO nanocomposites, *Anal. Methods*, 8 (2016) 4379–4390.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



CHAPTER 4

Au-IDA microelectrodes
modified with Au-doped graphene
oxide for the simultaneous determination
of ascorbic acid and uric acid in urine samples

1. Introduction

Uric acid (UA; 7,9-dihydro-1H-purine-2,6,8(3H)-trione) is a weak acid present in extracellular fluids as sodium urate. Since anomalous UA levels in biological fluids have been linked to several diseases, researchers have developed several methods to detect it. Some illnesses like gout, hypertension and cardiovascular disease, have been related to UA serum concentrations over 420 μM [1]. Other conditions like neurodegenerative diseases may be caused by UA concentrations lower than 120 μM [2]. Thus, UA normal levels in serum are established between 120 and 420 μM , with slight variations depending on the gender. Since recent studies have provided evidences that altered levels of UA in serum might have a role in the development of disease states [3], the manipulation of serum UA levels has been employed in the treatment of a variety of diseases [4]. Consequently, the development of a method to reliably quantify UA concentration in biological fluids has acquired increasing interest during the last decades.

As UA can be oxidised at common electrodes in aqueous solution, electrochemical sensors have been widely used for UA detection due to their advantages such as short analysis times, simple experimental procedures and economical instrumentation. However, the main disadvantage for the quantification of UA in biological fluids by electrochemical sensors is the presence of species whose oxidation takes place at potentials near the UA oxidation potential on most of the common

electrodes. This occurs with the oxidation of AA, resulting in a poor selectivity towards UA [5].

Moreover, the determination of AA in biological fluids is also very interesting, since it is well-known that AA is related to some diseases and that it cannot be synthesized by humans, thus it should be incorporated via diet [6]. A normal range of AA concentrations in plasma has been set between 50 and 80 μM [7,8]. An insufficient amount of AA causes symptoms of scurvy [9] and gastric irritations [10]. Furthermore, AA has an important role in healthy cell development, normal tissue growth and the healing of injuries, among other biochemical functions [11]. As a result, a huge effort has been done in order to detect and quantify both analytes separately and simultaneously in biological fluids, such as plasma or urine.

Electrochemical sensors based on carbon materials are commonly used for their low cost, good chemical stability, good electron transfer kinetics and biocompatibility. Specifically, graphene and its derivatives have been widely used in electrochemical sensors due to their physical and electrochemical properties [12]. At present, the use of GO, the oxygenated derivative of graphene, is the most promising material for the preparation of colloidal suspensions due to oxygen-containing functional groups on its surface, which provide hydrophilicity [13], facilitating its dispersion in aqueous media and conferring high tolerance towards chemical modification [14]. As a result of the easy processing and handling of GO and its electrochemical flexibility, most of the recent efforts in the electrochemical carbon-based sensors have been based on this material. The advantages of GO allow the preparation of more concentrated dispersions, resulting in a shorter time

for electrode modification. Moreover, the oxygen functional groups are amenable for bioconjugation towards the construction of biosensors, immunosensors and other devices [12]. The oxygen functional groups on GO can be reduced and regenerated electrochemically [15] with better electrical properties, high density of defects and edge-like planes. Such combined properties enhance fast electron transfer, enabling its application in electrochemical sensing and biosensing. In order to increase its sensitivity and selectivity, GO is usually functionalized with other materials, such as nanoparticles or polymers [16–21]. At present, several of the recent studies have combined gold nanoparticles with graphene-based materials for electrochemical sensors and biosensors, trying to take advantage of the catalytic character and biocompatibility of Au. The presence of surface oxygen groups in GO increases the interaction between the metal catalyst and support [13].

The detection and quantification of AA and UA have been performed by DPV with an electrochemical sensor based on GO modified with Au-NPs, achieving LODs of 20 μM and 200 μM , respectively [22]. However, the LOD obtained for AA should be improved due to the fact that levels of AA in plasma for healthy people are usually lower [7,8], and the detection of concentrations lower than 20 μM is also interesting [8,23]. The simultaneous determination of AA and UA within other compounds has been evaluated using a sensor based on overoxidized polyimidazole and GO copolymer by CV [24]. The proposed sensor exhibited a working response range between 75 and 2275 μM for AA, and between 3.6 and 249.6 μM for UA. Several works have been reported for the electroanalytical

determination of AA and UA in the presence of other compounds and most of them used a GC electrode as support of the modified-GO [17,18,20]. Benvidi et al. fabricated a reduced graphene oxide (rGO), Au-NPs and 2-(3,4-dihydroxyphenyl)benzothiazole-modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of levodopa, UA and folic acid [17]. Only a few publications may be found related to modified IDAs [21,25] or screen-printed electrodes [19], with a small size which makes the development of portable Lab-on-a-Chip devices feasible.

The aim of the present work is the preparation by a one-step method of an electroactive material based on GO with Au-NPs with low loadings supported on Au-IDA. Au-NPs were synthesized following a method which allows not only fine nanoparticle size and distribution control but also avoids the use of additional reducing agents, improving the cost-efficiency of the synthetic process [26]. The modified electrodes have been assessed in the simultaneous detection and quantification of AA and UA in biological fluids, also improving the LODs hitherto achieved by using GO as support of metallic nanoparticles. To the best of our knowledge, this is the first time that an interdigitated electrode array is modified with a Au-decorated GO sample, allowing the development of portable sensors for the simultaneous AA and UA determination.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipment

Uric acid ($\geq 99\%$, crystalline) and L-ascorbic acid (reagent grade, crystalline), dopamine hydrochloride, glucose and epinephrine standard chemicals,

glutaraldehyde (50%) and poly(styrenesulfonate) (PSS) were provided by Sigma-Aldrich. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4) obtained from Emsure[®] and Sigma-Aldrich respectively, were used to prepare buffer solution (PBS, 0.25 M, pH 7.0). Sulphuric acid (98%) was provided by AnalaR Normapur[®]. Ultrapure water was obtained by a treatment in Purelab Ultra Elga with a resistivity of 18 M Ω cm. Sodium hydroxide proanalysis (NaOH) was purchased from Merck.

The reagents employed in the Au-NPs synthesis, (poly-n-vinylpyrrolidone (PVP), anhydrous ethylene glycol, sodium tetrachloroaurate dehydrate ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), methanol and sodium hydroxide (NaOH; 99.99% purity) were purchased from Sigma-Aldrich. Isopore membrane filters (0.2 μm GTTP) from Millipore were employed for cleaning and drying of the material synthesized and absolute ethanol was purchased from PROLABO.

Transmission electron microscopic measurements (TEM) were carried out using a JEOL TEM, JEM-2010 model equipped with an Oxford X-ray detector (EDX), INCA Energy TEM 100 model, and GATAN acquisition camera. Scanning electron micrographs (SEM) were taken using an ORIUS SC600 model Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) using a ZEISS microscope, Merlin VP Compact model, with an EDX Bruker, Quantax 400 model.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed using a VG-Microtech Multilab 3000 spectrometer using non-monochromatized MgK α (1253.6 eV) radiation from a twin anode source operated at 300 W (20 mA, 15 kV). Photoelectrons were collected into a hemispherical analyser working

in the constant energy mode at pass energy of 50 eV. The binding energy (BE) of the C1s peak at 286.4 eV was taken as internal standard.

2.2. Preparation of GO decorated with Au-NPs

2.2.1. Synthesis and purification of GO decorated with Au-NPs

GO was prepared following the Hummers method improved by Marcano et al. [27].

Au-NPs were synthesized following a method based on the methodology described by Dominguez et al.[26] with several modifications which allows not only fine nanoparticle size and distribution control (as most chemical methods for the synthesis of metallic colloids, which represents a significant advantage over other methods) but also avoids the use of additional reducing agents, improving the cost-efficiency of the synthetic process. In order to control the nanoparticle size and to obtain a good size distribution, the synthesis was performed in an inert atmosphere in a Schlenk system unless stated otherwise.

In order to decorate the GO support with a 10 wt% of Au-NPs, the following method was applied. For solution 1, in a two-necked, round-bottom flask, 0.075 g of GO and 0.120 g of poly-n-vinylpyrrolidone (PVP) were added to 12 mL of anhydrous ethylene glycol. The mixture was maintained at 80°C under stirring conditions for 1 h. For solution 2, in a two-necked, round-bottom flask, 0.022 g of gold precursor ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was dissolved in 5 mL of methanol under stirring at room temperature during 1 h. The resulting solution was of yellowish.

After that, solution 1 was cooled at 0°C with an ice bath and solution 2 was added to solution 1, keeping the stirring to ensure a good homogenization. The pH of the resulting solution was adjusted to 9-10 by adding 0.5 mL of a 1 M NaOH solution and the mixture was heated at 100°C under vigorous stirring for 2 h. After 2 hours the flask was removed from the bath and cooled to room temperature.

The GO decorated with Au-NPs was purified with a vacuum filtration system. The sample on the filter was cleaned with an excess of ethanol and the solid obtained was dried in a vacuum oven at 40°C for 24 h.

2.2.2. Graphene oxide dispersions

Dispersions of 1 mg mL⁻¹ of GO and Au-GO were prepared in water. Both dispersions contained 1% PSS in order to achieve the dispersion of the carbon material. To obtain a proper dispersion, an ultrasound probe was applied for 10 min (QSonica, MODEL Q125, 100W). In order to avoid localized heating during sonication, the vessels containing the sample suspensions were immersed in an ice bath.

2.3. Preparation of Au-IDA modified electrodes

First, CV was performed in order to clean the gold (thin film of 150 nm) interdigitated microelectrodes array (Au-IDA, Micrux). The size of the WE is 10 µm. Then, ten cycles between -1.5 and 1.5 V versus the gold pseudo-reference at 0.1 V s⁻¹ in 0.05 M H₂SO₄ were applied.

Then the Au-IDA microelectrode was modified by casting the aqueous Au-GO dispersion obtaining the Au-GO/Au-IDA modified electrode. A Au-IDA

modified electrode with GO was also prepared for electrochemical characterization. In both kinds of electrodes, the weight of the GO-based material deposited was 5 μg . The method for the deposition was the dropwise addition of 0.5 μL of each dispersion and drying under an infrared lamp. Finally, 0.75 μL of glutaraldehyde was added to ensure that the solid material remains on the surface of the Au-IDA electrode. The scheme shown in Figure 4.1 illustrates the preparation procedure for the sensor electrode.

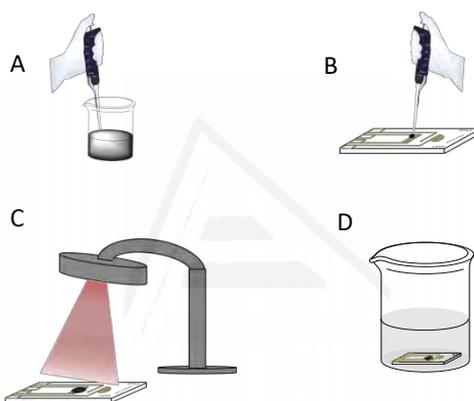


Figure 4.1. Schematic illustration of the preparation procedure of the sensor described in this study: A) Au-GO dispersion. B) Addition of 0.5 μL of Au-GO dispersion on Au-IDA electrode. C) Drying by an IR lamp. D) Storage in PBS (0.25 M, pH 7.0) until its use.

2.4. Electrochemical methods

All electrochemical measurements were carried out on a BIOLOGIC SP-300 potentiostat. A three-electrode configuration was used, in which the electrode modified with GO-based material was the WE, a reversible hydrogen electrode (RHE) was the RE and a Pt wire was the CE. The electrochemical cell was completely deoxygenated during measurements by bubbling nitrogen. All potentials presented are referred to the RHE electrode.

To identify the analytes, CV was carried out in order to know at which potential the oxidation of AA and UA occurs. For that, a concentrated UA stock solution (100 mM) was prepared in PBS (0.25 M, pH 7.0) at a pH higher than 8.4 and then diluted ten times. A concentrated AA stock solution (135 mM) was also prepared. Three different aliquots from the stock solutions were added to the electrochemical cell to reach the desired concentration ($C_{AA} = 75, 175$ and $275 \mu\text{M}$; $C_{UA} = 200, 400$ and $600 \mu\text{M}$). Afterwards, CV was applied between 0.3 and 1.3 V.

Quantification of AA and UA was carried out by chronoamperometry. A total of fourteen aliquots of UA were added reaching concentrations between $0.62 \mu\text{M}$ and 1.05 mM . For AA, twenty-two AA additions were performed, in the concentration range between $1.4 \mu\text{M}$ and 1 mM . Stirring was kept during the experiments to ensure a good homogenization. All measurements were carried out in PBS (0.25 M, pH 7.0) and by triplicate in order to determine analytical parameters.

It is important to highlight that since the pH of the physiological fluids employed is higher than the pK_{a1} of these analytes, the quantification of ascorbate monoanion (HA^-) [8] and urate (HU^-) [28] has been determined. However, these analytes will be referred to as AA and UA throughout the manuscript, respectively.

For real samples determination, filtered urine was diluted 20 times in PBS (0.25 M, pH 7.0) and no other treatment was carried out.

3. Results and discussion

3.1. Au-GO/Au-IDA electrodes characterization

3.1.1. Electrochemical characterization

The electrochemical behavior of GO/Au-IDA and Au-GO/Au-IDA electrodes was studied by CV in PBS (0.25 M, pH 7.0). Figure 4.2 depicts the voltammograms registered between 0.0 and 1.8 V with a scan rate of 0.1 V s^{-1} .

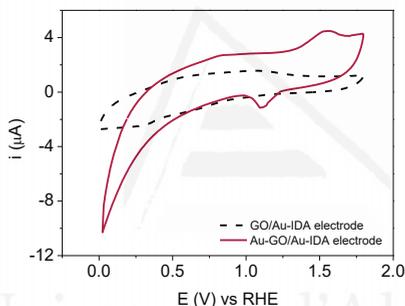


Figure 4.2. Steady state voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0), $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. Electrodes used: GO/Au-IDA (dashed line) and Au-GO/Au-IDA (solid line).

Twelve cycles between 0.0 and 1.8 V were performed and from cycle 8 steady voltammograms were obtained.

For GO/Au-IDA electrode (Figure 4.2, dashed line), the formation of the electrical double layer is manifested by the rectangular shape of the voltammogram between 0.5 and 1.8 V. For Au-GO/Au-IDA electrode (solid line in Figure 4.2), the oxidation process of the Au surface at 1.5 V is observed during the positive scan and the reduction peak at 1.1 V related to the desorption of oxygen from the Au surface can be clearly seen. In

addition, a high cathodic current can be seen due to the electrocatalytic effect of the Au-NPs in the hydrogen reduction reaction on the Au surface.

3.1.2. Structural characterization

Figure 4.3 shows two representative TEM images for the GO and the Au-GO dispersions. As it can be seen in Figure 4.3A, single layer structured GO flakes with a smooth surface were provided.

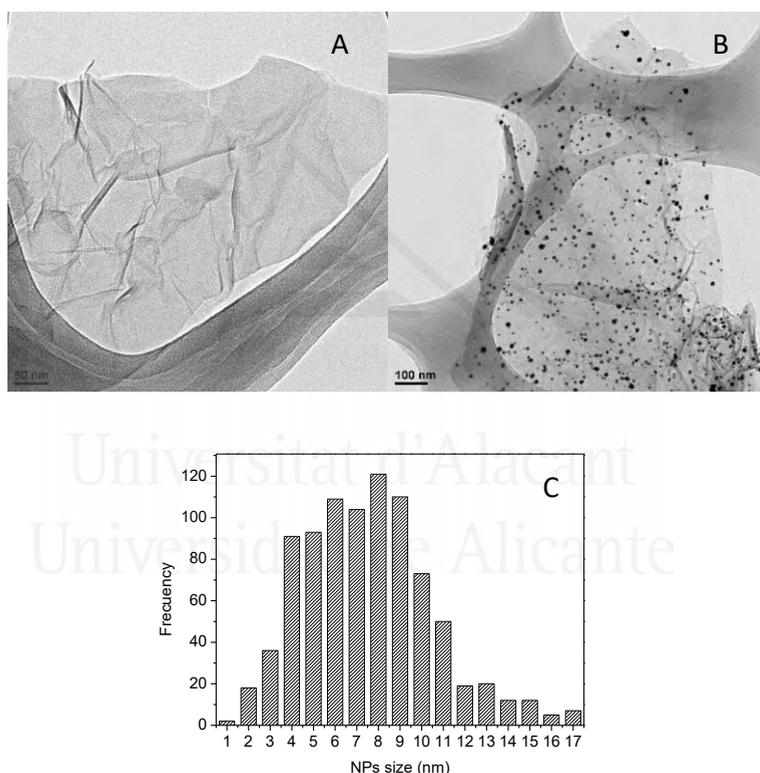


Figure 4.3. TEM images of: A) GO dispersion. B) Au-GO dispersion. C) Histogram of Au-NPs size.

The TEM micrograph of Au-GO dispersion (Figure 4.3B) shows a uniform distribution of the Au-NPs on GO surface, with an average particle size between 4 and 9 nm, as shown in the histogram (Figure 4.3C). The presence

of wrinkles in Figure 4.3A is an evidence of the conformational flexibility of GO, which is the reason why GO is locally folded in double or multiple layers [29].

The surface morphology of the modified electrode (Au-GO/Au-IDA) was characterized by FESEM. Figure 4.4 presents a material with several layers of graphene. The spots observed in Figure 4.4 correspond to the Au-NPs. It can be observed that the nanoparticles are homogeneously distributed on the electrode and the entire Au-IDA electrode surface is covered. Figure 4.4 also shows the same sheet wrinkling, which indicates the presence of several layers of GO.

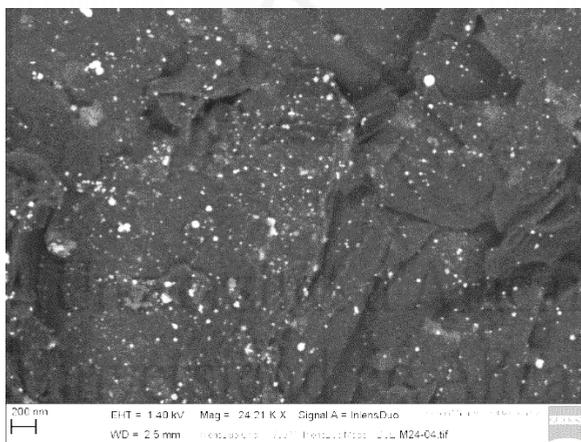


Figure 4.4. FESEM image for Au-GO/Au-IDA modified electrode.

XPS was used in order to determine the state of the main constituents of the dispersion (namely, Au, C and O). The elemental contents of C, O and Au were also quantified for both dispersions. Figure 4.5 shows the XPS spectra of Au for the Au-GO dispersion, in which a single peak appears for the Au $4f_{7/2}$ and Au $4f_{5/2}$ signals which may be assigned to zerovalent Au. The results for the pristine GO dispersion had a C and O contents of 80 wt% and 20 wt%,

respectively. For the Au-GO dispersion the XPS results showed a 1.9 wt% of Au, 81.3 wt% of C and 16.8 wt% of O in the sample. Comparing the results obtained in both dispersions a decrease in the amount of oxygen after Au-NPs were synthesized on GO (20 wt% O for GO dispersion vs 16.8 wt% O for Au-GO dispersion) can be seen, which may be ascribed to the presence of the metallic particles. This observation is corroborated by the fact that the C1s XPS spectra for both samples (results not shown) were very similar, with negligible variations in the relative intensities of the peaks which may be ascribed to graphitic carbon (peak at 284.9 eV), phenol or ether-related groups (286.3 eV), quinone-related groups (287.5 eV) and carboxyl or ester-related groups (288.9 eV) [30].

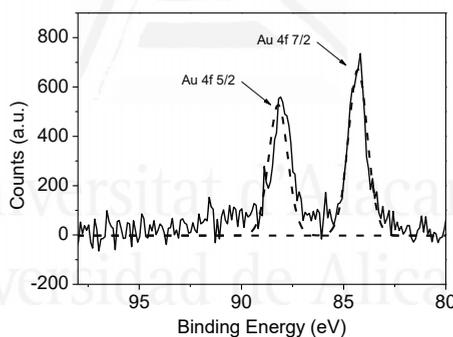


Figure 4.5. XPS spectra for Au-GO dispersion.

3.2. Electrochemical determination of AA and UA on Au-GO/Au-IDA electrodes

The electrochemical oxidation activity of Au-GO/Au-IDA modified electrode towards AA and UA was investigated. Figure 4.6 shows the voltammograms obtained for three concentrations of AA (Figure 4.6A) and UA (Figure 4.6B).

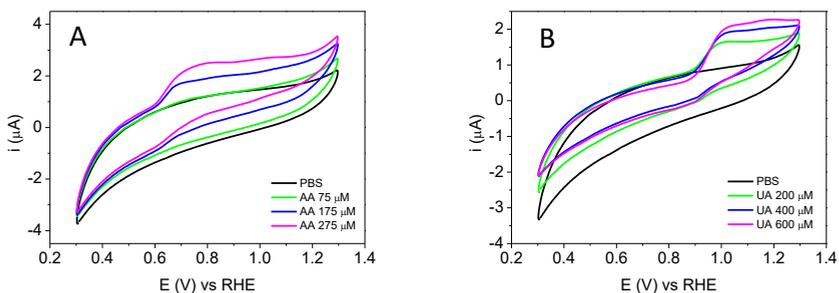


Figure 4.6. Cyclic voltammograms for Au-GO/Au-IDA electrode for: A) different AA concentrations: 0 μM (black line), 75 μM (green), 175 μM (blue) and 275 μM (pink). B) Different UA concentrations: 0 μM (black line), 200 μM (green), 400 μM (blue) and 600 μM (pink). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

A peak around 0.7 V due to the oxidation of AA (Figure 4.6A) and a peak around 1.0 V related to the oxidation of UA (Figure 4.6B) can be observed. In order to minimize any possible interferences usually found in biological fluids, the oxidation potentials selected for AA (0.75 V) and UA (1.0 V) detection by amperometric methods were the minimum possible without causing a substantial sensitivity decrease in the detection of either AA or UA, respectively.

Figure 4.7 exhibits the amperometric response of Au-GO/Au-IDA electrode towards the several additions of AA and UA in PBS (0.25 M, pH 7.0). Figure 4.7A and Figure 4.7B show the i - t curves obtained with the modified electrode towards AA additions at a fixed potential of 0.75 V. The corresponding calibration curve obtained is shown in Figure 4.8A.

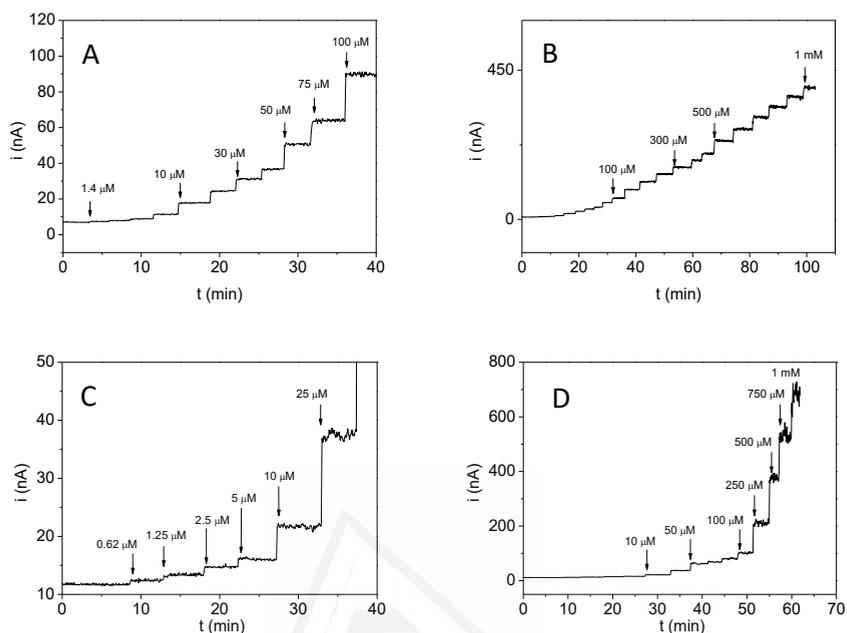


Figure 4.7. *i-t* curves for Au-GO/Au-IDA electrode to successive additions of: A-B) AA at 0.75 V. C-D) UA at 1.0 V in stirred PBS (0.25 M, pH 7.0). $E_i = 0.5$ V.

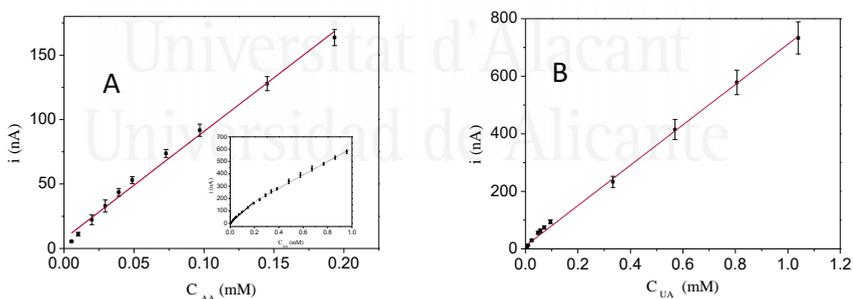


Figure 4.8. Calibration curves for Au-GO/Au-IDA modified electrodes towards: A) AA additions. Inset: AA concentration range evaluated. B) UA additions. Data corresponding to Figure 4.7.

As it can be observed in Figure 4.8A (Inset), the analytical range studied seems to be characterized by two linear ranges, which means that the functional relationship is not linear in the whole studied concentration

range. The reduction of the concentration range is one of the most widespread strategies to solve this [31]. To achieve this, a linear response range between 0 and 193 μM is established, with a LOD and LOQ of 1.4 μM and 4.6 μM , respectively. The linear regression function is indicated by Equation 4.1, with a correlation coefficient given by $r = 0.996$ ($N = 10$).

$$i_{\text{AA}} \text{ (nA)} = (830 \pm 60) C_{\text{AA}} \text{ (mM)} + (7 \pm 5) \quad \text{Equation 4.1}$$

In Figure 4.7C and Figure 4.7D, the i - t curves obtained at 1.0 V for successive aliquots of UA can be observed and the corresponding calibration curve is plotted in Figure 4.8B. A linear response range was found for UA oxidation between 0 and 1.05 mM. The LOD and LOQ obtained were 0.62 μM and 2 μM , respectively. The linear equation is given in Equation 4.2 with a correlation coefficient given by $r = 0.999$ ($N = 12$).

$$i_{\text{UA}} \text{ (nA)} = (728 \pm 16) C_{\text{UA}} \text{ (mM)} + (13 \pm 7) \quad \text{Equation 4.2}$$

All analytical figures of merit calculated for the quantification of AA and UA are summarized in Table 4.1. The LOD was determined empirically, measuring progressively more diluted concentrations of the analyte. The LOD was the lowest concentration whose signal could be clearly distinguished from the blank. Moreover, the LOQ was calculated as 3.3 times the LOD ($\text{LOQ} = 3.3\text{LOD}$) [32]. The RSD values were obtained for 3 replicates at 20 μM concentration level of UA and AA.

Table 4.1. Analytical figures of merit for the quantification of AA and UA by the Au-GO/Au-IDA modified electrode

Parameter	Analyte	
	AA	UA
Sensitivity (nA mM ⁻¹)	830 ± 60	728 ± 16
Intercept (nA)	7 ± 5	13 ± 7
r	0.996	0.999
N	10	12
n	3	3
Linear range (μM)	0-193	0-1050
LOD (μM)	1.4	0.62
LOQ (μM)	4.6	2
RSD (%)	16	13
(n = 3; 20 μM)		

3.3. Simultaneous detection of AA and UA

In order to study the simultaneous detection of AA and UA, CV was performed in a solution containing the two analytes. Figure 4.9 shows the voltammograms obtained for the AA and UA interference study. Figure 4.9A displays the behavior of Au-GO/Au-IDA electrode for a UA concentration of 600 μM and successive aliquots from a stock solution of AA until reaching concentrations between 30 and 90 μM. The voltammograms obtained do not show differences after the additions of AA in this range of concentrations.

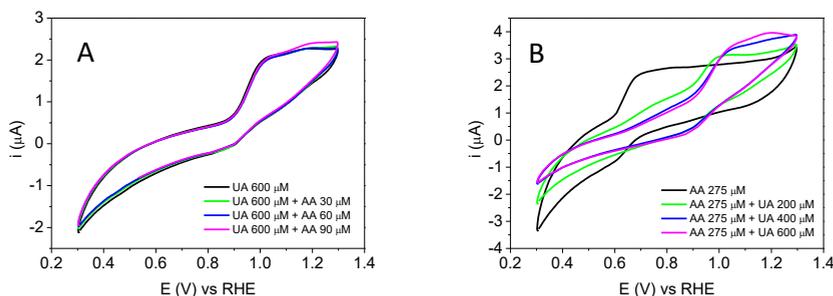


Figure 4.9. Cyclic voltammograms of Au-GO/Au-IDA modified electrode for successive additions of: A) AA on a solution of UA 600 μM (black line: 0 μM AA; green: 30 μM AA; blue: 60 μM AA; pink: 90 μM AA). B) UA on a solution of AA 275 μM (black line: 0 μM UA; green: 200 μM UA; blue: 400 μM UA; pink: 600 μM UA). Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$.

The results obtained for the addition of UA aliquots in a solution containing 275 μM AA are presented in Figure 4.9B. As it is exhibited in the voltammetric curves, the current of the voltammetric peak owing to AA oxidation ($E = 0.75 \text{ V}$) decreased after UA aliquots were added. Then, it seems that UA interferes in the voltammetric response of AA. As a result, the amperometric responses for minimum and maximum levels of AA and UA were determined to have a broad knowledge about how each analyte interferes in the determination of the other.

The interference study of UA and AA has been performed by chronoamperometry at 0.75 V and 1.0 V, respectively, and with concentrations higher than the normal values in serum. Figure 4.10 and Figure 4.11 display the $i-t$ curves recorded for the interference study.

Figure 4.10 evidences the effect of the addition of UA with a concentration between 120 μM and 1.0 mM in the current at 0.75 V when the concentration of AA is 30 μM (Figure 4.10A) and 90 μM (Figure 4.10B), respectively, in the PBS solution.

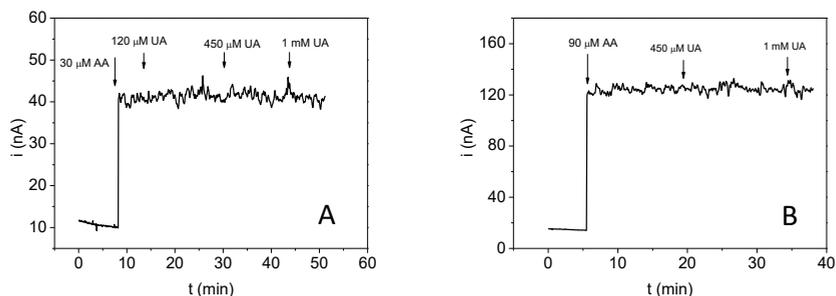


Figure 4.10. *i-t* curves obtained for the interference study of UA on: A) AA 30 μM . B) AA 90 μM . $E_i = 0.5\text{ V}$, $E_f = 0.75\text{ V}$. Electrode used: Au-GO/Au-IDA. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

As it can be observed, additions of UA with a concentration within the established lineal range (120-1000 μM), do not change the intensity of the AA oxidation current measured at 0.75 V. Thus, the present method should be able to quantify AA with UA being present in the serum samples.

On the other hand, Figure 4.11 shows the effect of the addition of AA with a concentration between 30 and 90 μM in the UA oxidation current at 1.0 V when the UA concentration in the solution is 120 μM (Figure 4.11A) and 450 μM (Figure 4.11B).

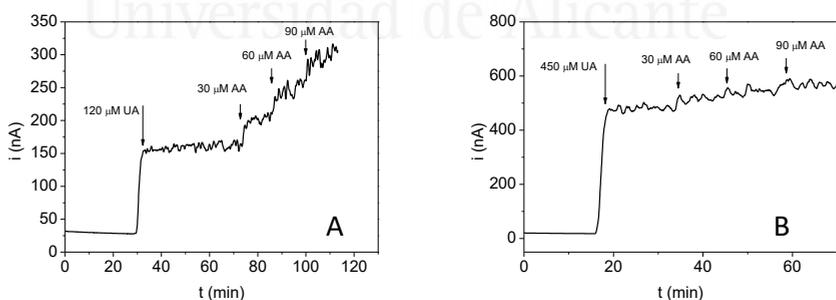


Figure 4.11. *i-t* curves obtained for the interference study of AA on: A) UA 120 μM . B) UA 450 μM . $E_i = 0.5\text{ V}$, $E_f = 1.0\text{ V}$. Electrode used: Au-GO/Au-IDA. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

It can be observed for the lowest UA concentration established in serum (120 μM , Figure 4.11A) that additions of AA lead to an increase on the current measured at 1.0 V potential. That means that AA interferes in the quantification of low concentrations of UA.

However, when the UA concentration is the highest allowed for healthy people (around 450 μM), Figure 4.11B depicts how the AA additions lead to a small increase in the measured current (21, 11 and 33 nA for the 1st, 2nd and 3rd aliquot, respectively). Taking into account that confidence limits for this concentration values are about ± 30 nA, this increase can be considered included in the experimental error of the measurements. As a result, this method is able to quantify UA in unhealthy people (UA concentration at least 450 μM) in the presence of AA up to a concentration of 60 μM .

In order to apply the present method to healthy people, whose UA levels are lower than 450 μM , the following strategy may be applied: 1) calibration curve of AA at 0.75 V and 2) calibration curve of UA at 1.0 V potential in the presence of the amount of AA in the real sample. In addition, the sample, which contains a mixture of AA and UA, will be subjected to chronoamperometry. First of all, the *i-t* curves at 0.75 V and 1.0 V potential of the sample will be recorded. The *i-t* curve at 0.75 V will provide a current value ($i_{\text{AA},1}$), which is directly related to the concentration of AA (C_{AA}) by the linear function of calibration curve 1. From the *i-t* curve at 1.0 V, a second current value ($i_{\text{T}} = i_{\text{AA},2} + i_{\text{UA}}$) will be obtained, from which the amount of UA in the sample can be quantified by using the linear function of calibration curve 2, which has been made with the amount of AA that was present in the real sample.

3.4. Study of other interferences

Other possible interferences, like glucose, DP and epinephrine (EP) were investigated by chronoamperometry at 0.75 V and 1.0 V in PBS (0.25 M, pH 7.0) to know if the presence of these analytes in physiological fluids are able to modify the signal belonging to the oxidation of AA and UA.

In order to study the interference of these compounds, concentrations of glucose (5 mM) [33], DP (1 μ M) [34,35], and EP (0.5 μ M) were used, being these concentrations higher than the usually found in serum [36,37]. Interferences at 0.75 V and 1.0 V were investigated in a 50 μ M AA solution and 420 μ M UA solution, respectively, being these concentrations usually found in serum, and the results obtained are displayed in Figure 4.12.

As it can be observed in Figure 4.12 the addition of glucose, DP and EP does not change the current corresponding to the oxidation of AA at 0.75 V (Figure 4.12A) and UA at 1.0 V (Figure 4.12B). As a result of that, it can be concluded that the method developed is able to quantify AA and UA, even in the presence of the analytes studied above.

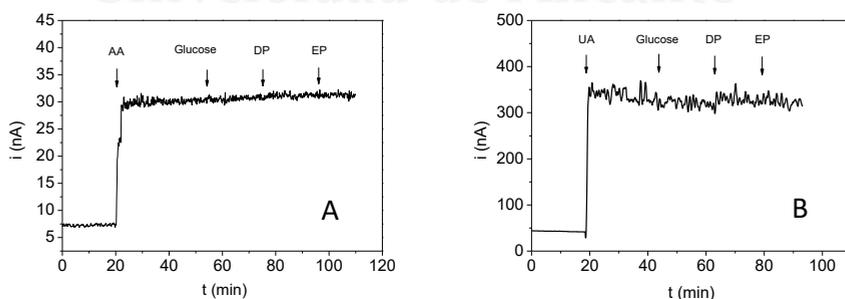


Figure 4.12. i - t curves for the interference study of 5 mM glucose, 1 μ M DP and 0.5 μ M EP on: A) AA solution (50 μ M) at 0.75 V. B) UA solution (420 μ M) at 1.0 V. $E_i = 0.5$ V. Electrode used: Au-GO/Au-IDA. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

Finally, Table 4.2 shows a comparison of some analytical parameters obtained in this work, with others results previously reported.

Table 4.2. Comparison of analytical characteristics for several electrochemical AA and UA sensors.

	LOD (μM)		Working Range (μM)		Ref.
	AA	UA	AA	UA	
Mesoporous nitrogenrich carbon/GCE	0.01	0.01	1 - 700	0.01 - 80	[38]
Cysteine sonogel-carbon modified electrode	50	10	50-100	10-100	[39]
[Ni(phen) ₂] ²⁺ -SWCNTs/GCE	12	0.76	30-1546	1-1407	[40]
CNF-CPE	2	0.2	2-64	0.8-16.8	[41]
Reduced graphene oxide/GCE	300	0.5	500-2000	0.5-60	[42]
AuRGO/GCE	51	1.8	240-1500	8.8-53	[43]
Au@Pd-RGO/GCE	0.02	0.005	0.1-1000	0.02-500	[44]
Au-GO/GCE	200	20	200-800	20-260	[22]
Au-GO/Au-IDA	1.4	0.62	4.6-193	2-1050	This work

It can be observed that the proposed sensor is competitive, representing therefore a good and interesting alternative. Moreover, the LODs and LOQs achieved with the proposed sensor are greatly improved with respect to

those shown in a recent publication about this topic [22], whose similarity lies in the same electrode material.

3.5. Human urine samples

A human urine sample from a healthy person was analysed by the standard addition method due to matrix effects, which caused the displacement of the oxidation peaks related to AA and UA to more positive potentials (results not shown). Despite the fact that the possible interferences have been studied in PBS with proper results, urine is a complex matrix with several components like proteins that can block the active sites on the electrode. Filtered urine was diluted 20 times in PBS (0.25 M, pH 7.0) and no other treatment was carried out.

The calibration curves for AA and UA were obtained by chronoamperometry at 0.95 V and 1.2 V, respectively, for the same concentrations of AA and UA studied in Figure 4.7 and in the presence of the urine sample. The concentration of AA determined was (0.588 ± 0.002) mM or (155.3 ± 0.7) mg/24 h (based on a 1.5 L total urine volume in 24 hours [45]). The average AA value excreted by urine in 24 hours has been determined in 34 mg. However, that value can be changeable, for example, a high concentration of 450 mg/24 h has been found after the ingestion of 700 mg of AA [46]. For that reason, the AA concentration found in the present work is not surprising.

On the other hand, the urine sample had a concentration of (1.43 ± 0.02) mM of UA or (361 ± 5) mg/24 h, values which are within the normal levels of UA (200-2000 mg/24 h [47] or 1.4-3.3 mM [48]).

Inter-sensor reproducibility was studied using five electrodes prepared using the method described in section 2.3. The obtained results yielded RSD values about 27% for AA and about 9% for UA determination which prove the reliability of the developed method (Figure 4.13).

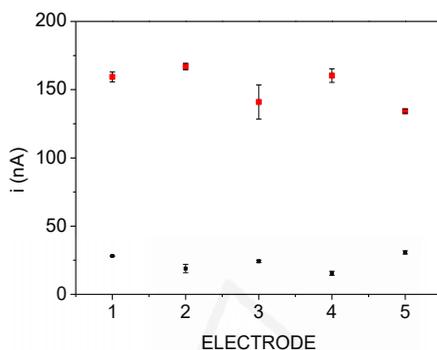


Figure 4.13. Inter-sensor reproducibility studied on urine sample by chronoamperometry with five electrodes at 0.95 V (black dots) and 1.2 V (red dots). $E_i = 0.5$ V. Electrode used: Au-GO/Au-IDA. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

4. Conclusions

An electrochemical method based on the modification of an array of gold interdigitated microelectrodes by graphene oxide decorated with gold nanoparticles (Au-GO/Au-IDA) has been developed for the quantification of AA and UA in urine samples. In order to simulate physiological human fluids all investigations have been carried out in PBS (0.25 M, pH 7.0). The Au-GO/Au-IDA modified electrode exhibits a linear range between 0 and 193 μ M for AA and between 0 and 1.05 mM for UA, achieving LODs of 1.4 μ M and 0.62 μ M, respectively. These good values make possible the application of the method in serum samples, or other biological fluids, even when the AA and UA concentrations are lower than the normal values in serum.

The simultaneous quantification of AA and UA has been investigated. No interference of UA in the AA measurements has been successfully carried out. On the other hand, AA does not interfere in the UA quantification for UA concentrations higher than 450 μM . For lower concentrations of UA, an easy and fast strategy to quantify both analytes was presented. The proposed sensor showed excellent antiinterference properties against glucose, dopamine and epinephrine and it has been favorably applied on the analysis of real urine samples.

5. References

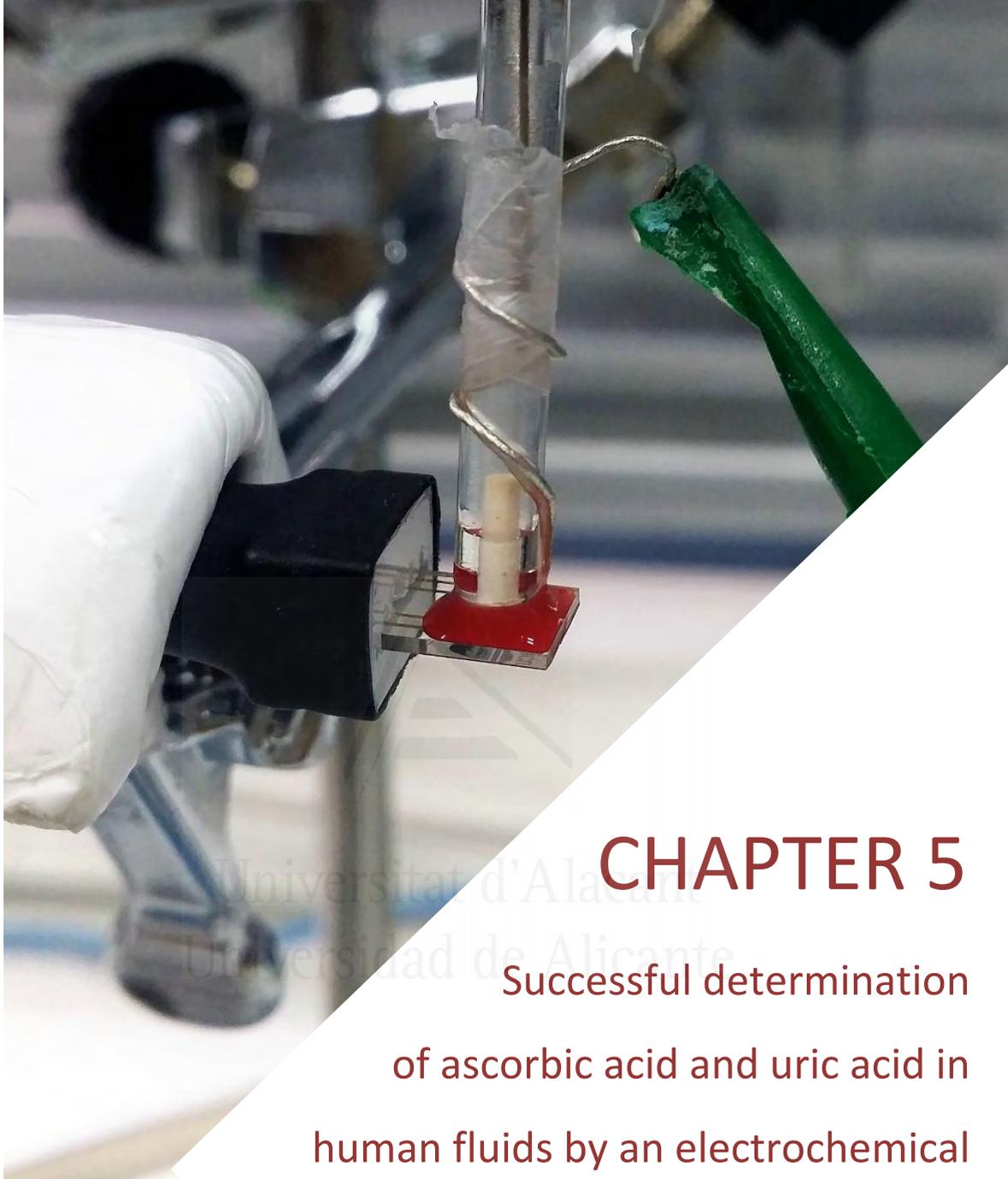
- [1] R.J. Johnson, D.-H. Kang, D. Feig, S. Kivlighn, J. Kanellis, S. Watanabe, K.R. Tuttle, B. Rodriguez-Iturbe, J. Herrera-Acosta, M. Mazzali, Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?, *Hypertension*, 41 (2003) 1183–1190.
- [2] I. Hisatome, M. Tsuboi, C. Shigemasa, Renal hypouricemia, *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.*, 54 (1996) 3337–3342.
- [3] M. Mazzali, J. Hughes, Y.-G. Kim, J.A. Jefferson, D.-H. Kang, K.L. Gordon, H.Y. Lan, S. Kivlighn, R.J. Johnson, Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism, *Hypertension* 38 (2001) 1101–1106.
- [4] M.K. Kutzing, B.L. Firestein, Altered uric acid levels and disease states, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (2008) 1–7.
- [5] D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, P.S. Sharma, B.B. Prasad, Electrochemical detection of uric acid in mixed and clinical samples: a review, *Electroanalysis*, 23 (2011) 305–320.
- [6] V. Valpuesta, M.A. Botella, Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant, *Trends Plant Sci.*, 9 (2004) 573–577.
- [7] A.A. Fowler, A.A. Syed, S. Knowlson, R. Sculthorpe, D. Farthing, C. DeWilde, C.A. Farthing, T.L. Larus, E. Martin, D.F. Brophy, S. Gupta, Medical Respiratory Intensive Care Unit Nursing, B.J. Fisher, R.

- Natarajan, Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis, *J. Transl. Med.*, 12 (2014) 32–42.
- [8] J. Du, J.J. Cullen, G.R. Buettner, Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, 1826 (2012) 443–457.
- [9] S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.*, 22 (2003) 18–35.
- [10] P. B. Nunn, Oxalic acid in biology and medicine, *FEBS Lett.*, 101 (1979) 421–421.
- [11] S. Chambial, S. Dwivedi, K.K. Shukla, P.J. John, P. Sharma, Vitamin C in disease prevention and cure: an overview, *Indian J. Clin. Biochem.*, 28 (2013) 314–328.
- [12] S.K. Vashist, J.H.T. Luong, Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites, *Carbon*, 84 (2015) 519–550.
- [13] 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*, 45 (2007) 1558–1565.
- [14] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2009) 228–240.
- [15] E.L.K. Chng, M. Pumera, Solid-state electrochemistry of graphene oxides: absolute quantification of reducible groups using voltammetry, *Chem. – Asian J.*, 6 (2011) 2899–2901.
- [16] K.R. Ratinac, W. Yang, J.J. Gooding, P. Thordarson, F. Braet, Graphene and related materials in electrochemical sensing, *Electroanalysis*, 23 (2011) 803–826.
- [17] A. Benvidi, A. Dehghani-Firouzabadi, M. Mazloum-Ardakani, B.-B.F. Mirjalili, R. Zare, Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid and folic acid, *J. Electroanal. Chem.*, 736 (2015) 22–29.
- [18] L. Yang, N. Huang, Q. Lu, M. Liu, H. Li, Y. Zhang, S. Yao, A quadruplet electrochemical platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen

- based on a ferrocene derivative functional Au NPs/carbon dots nanocomposite and graphene, *Anal. Chim. Acta*, 903 (2016) 69–80.
- [19] S. Azzouzi, L. Rotariu, A.M. Benito, W.K. Maser, M. Ben Ali, C. Bala, A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker, *Biosens. Bioelectron.*, 69 (2015) 280–286.
- [20] H. Shu, G. Chang, J. Su, L. Cao, Q. Huang, Y. Zhang, T. Xia, Y. He, Single-step electrochemical deposition of high performance Au-graphene nanocomposites for nonenzymatic glucose sensing, *Sens. Actuators B Chem.*, 220 (2015) 331–339.
- [21] H.Y. Kim, K.J. Jang, M. Veerapandian, H.C. Kim, Y.T. Seo, K.N. Lee, M.-H. Lee, Reusable urine glucose sensor based on functionalized graphene oxide conjugated Au electrode with protective layers, *Biotechnol. Rep.*, 3 (2014) 49–53.
- [22] H. Imran, P.N. Manikandan, V. Dharuman, Facile and green synthesis of graphene oxide by electrical exfoliation of pencil graphite and gold nanoparticle for non-enzymatic simultaneous sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *RSC Adv.*, 5 (2015) 63513–63520.
- [23] German Nutrition Society (DGE), New reference values for vitamin C intake, *Ann. Nutr. Metab.*, 67 (2015) 13–20.
- [24] X. Liu, L. Zhang, S. Wei, S. Chen, X. Ou, Q. Lu, Overoxidized polyimidazole/graphene oxide copolymer modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, guanine and adenine, *Biosens. Bioelectron.*, 57 (2014) 232–238.
- [25] R. Lanche, L.E. Delle, M. Weil, X.T. Vu, V. Pachauri, W.M. Munief, P. Wagner, S. Ingebrandt, Routine fabrication of reduced graphene oxide microarray devices via all solution processing, *Phys. Status Solidi A*, 210 (2013) 968–974.
- [26] S. Domínguez-Domínguez, J. Arias-Pardilla, Á. Berenguer-Murcia, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Electrochemical deposition of platinum nanoparticles on different carbon supports and conducting polymers, *J. Appl. Electrochem.*, 38 (2007) 259–268.
- [27] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS Nano.*, 4 (2010) 4806–4814.
- [28] Z. Wang, E. Königsberger, Solubility equilibria in the uric acid–sodium urate–water system, *Thermochim. Acta*, 310 (1998) 237–242.

- [29] F. Perrozzi, S. Prezioso, L. Ottaviano, Graphene oxide: from fundamentals to applications, *J. Phys. Condens. Matter.*, 27 (2015) 13002.
- [30] A.P. Terzyk, The influence of activated carbon surface chemical composition on the adsorption of acetaminophen (paracetamol) in vitro - Part II. TG, FTIR, and XPS analysis of carbons and the temperature dependence of adsorption kinetics at the neutral pH, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, 1 (2001) 23–45.
- [31] E. Desimoni, B. Brunetti, Presenting analytical performances of electrochemical sensors. Some Suggestions, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1645–1651.
- [32] Miller, J., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson, 6th edition, 2010.
- [33] J. Wang, Electrochemical glucose biosensors, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 814–825.
- [34] C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton, Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Anal. Chim. Acta*, 662 (2010) 105–127.
- [35] K. Hashizume, A. Yamatodani, T. Ogihara, Free and total dopamine in human plasma: effects of posture, age and some pathophysiological conditions, *Hypertens. Res.*, 18 (1995) S205–S207.
- [36] H. Devnani, S.P. Satsangee, R. Jain, A novel graphene-chitosan-Bi₂O₃ nanocomposite modified sensor for sensitive and selective electrochemical determination of a monoamine neurotransmitter epinephrine, *Ionics*, (2015) 1–14.
- [37] D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, I.J. Kopin, Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305 (2003) 800–811.
- [38] A. Joshi, W. Schuhmann, T. C. Nagaiah, Mesoporous nitrogen containing carbon materials for the simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *Sens. Actuators B Chem.*, 230 (2016) 544–555.
- [39] M. Choukairi, D. Bouchta, L. Bounab, M. Ben atyah, R. Elkhamlichi, F. Chaouket, I. Raissouni, I.N. Rodriguez, Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid: Application in serum, *J. Electroanal. Chem.*, 758 (2015) 117–124.
- [40] S. Yan, X. Li, Y. Xiong, M. Wang, L. Yang, X. Liu, X. Li, L.A.M. Alshahrani, P. Liu, C. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid,

- dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with the nickel(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex and single-walled carbon nanotubes, *Microchim. Acta*, (2016) 1–8.
- [41] Y. Liu, J. Huang, H. Hou, T. You, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 1431–1434.
- [42] L. Yang, D. Liu, J. Huang, T. You, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, *Sens. Actuators B Chem.*, 193 (2014) 166–172.
- [43] C. Wang, J. Du, H. Wang, C. 'e Zou, F. Jiang, P. Yang, Y. Du, A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *Sens. Actuators B Chem.*, 204 (2014) 302–309.
- [44] J. Jiang, X. Du, Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites, *Nanoscale*, 6 (2014) 11303–11309.
- [45] J.C. Fanguy, C.S. Henry, The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Electrophoresis*, 23 (2002) 767–773.
- [46] F.T. Thorpe, Ascorbic Acid in Urine, *Br. Med. J.*, 1 (1938) 542.
- [47] Damm, H.C., *Handbook of clinical laboratory data*, The Chemical Rubber Company, Cleveland, 1965.
- [48] Kissinger, P.T., Pachla, L.A., Reynolds, LD., Wright, S., *Analytical methods for measuring uric acid in biological samples and food products*, 1987 *J. Assoc. Anal. Chem.*, 70 (1), 1-14.



CHAPTER 5

Successful determination
of ascorbic acid and uric acid in
human fluids by an electrochemical
and portable sensor based on 4-aminobenzoic
acid-functionalized herringbone carbon nanotubes

1. Introduction

Ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) are of great importance to the physiology of living organisms due to they are involved in several biological functions. Research about developing methods for the accurate determination of AA and UA in the field of health-care has increased, since it is known that concentration levels of these analytes in physiological fluids may be related to several diseases. Elevated concentrations of UA are associated with hypertension, vascular disease, renal disease, and cardiovascular events, while low concentrations have been related to neurodegenerative diseases [1,2]. Additionally, the interest of the determination of the AA levels in human fluids lies on the impossibility of humans to synthesized it [3], together with the fact that anomalous concentrations have been linked to several illnesses like scurvy [4] or gastric irritation [5]. Therefore, the accurate quantification of these analytes is crucial for diseases diagnoses. In order to accomplish this aim, electrochemical methods are a suitable option. Not only are they easy, low-cost and fast, but are also accurate and provide high sensitivities [6,7].

Carbon materials might be the most widely used in electroanalysis and electrocatalysis because of their outstanding properties [8,9]. Particularly, CNTs are excellent electrode materials due to their high electrical conductivity, high surface area, high mechanical resistance and modifiable surface chemistry, as well as their relative chemically inertness in most electrolyte solutions [10–12]. There are different kinds of CNTs according to their structure, which rules out their properties. Herringbone (hCNTs) and

bamboo-like CNTs have a high number of edge-plane-like defect sites, which are responsible for much of their high chemical and electrochemical reactivity [12,13]. The main drawback related to CNTs, is that they tend to aggregate in almost all of aqueous and organic solvents, due to the Van der Waals forces between them [10,14]. As a consequence, research about functionalization of CNTs has increased during the last decade in order to improve their dispersibility, extending their applications that otherwise could not be acquired by pristine ones [12,15–20].

The purpose of the functionalization of CNTs is not only for enhance their dispersibility in aqueous solvents [15], it also allows to tailor-make electrodes, which offer several advantages for catalysis, analysis and biological applications [12,21]. There are several strategies for modifying the CNTs surface, in which electrochemical functionalization provides an efficient, clean and more versatile alternative [18]. Even though the role of nitrogen functionalities is not still well-understood, nitrogen functionalization has received much attention because of significant changes in hardness, electrical conductivity and chemical reactivity have been observed after the carbon material was doped [22,23]. Functionalization of CNTs with three aminobenzene acids has been successfully achieved, evaluating the effect of carboxylic, sulphonic and phosphonic groups. Best results about nitrogen contents and electrocatalytic behavior towards the oxygen reduction reaction (ORR) were obtained for CNTs modified with 4-aminobenzene acid (4-ABA) with a post heat treatment in an oxidant atmosphere [20].

Functionalized and non-functionalized CNTs modified electrodes have been employed for the electroanalytical determination of several compounds related to the health-care field. For instance, simultaneous or individual determination of AA and UA has been successfully achieved with pure CNTs [24], functionalized CNTs with polymers [25–28] or metal nanoparticles [29,30]. It has been demonstrated that doping the CNTs with nitrogen [31–33] or boron [31] sources will enhance the sensitivity towards the AA and UA quantification. Furthermore, the synergistic effect between several carbon materials towards quantification of AA and UA has been evaluated by mixing GO and CNTs [34], or graphene and CNTs [35], among others. However, all these methods summarized above have been performed by modifying a GC or carbon paste-based electrode, which makes no feasible the development of portable electrochemical devices. There are few studies about screen-printed electrodes modified with CNTs for the individual determination of AA [36–38], UA [39], and for the simultaneous quantification of both AA and UA [40]. Extending the search to all carbon materials, graphene has been used for the fabrication of interdigitated electrodes, which can be applied for the determination of AA, among other analytes [41]. Recently, our research group has employed graphene stabilized with riboflavin for the development of a voltammetric method for the quantification of UA with and without AA [42] (Chapter 3). Also, GO with Au-NPs has been developed to modify an interdigitated microelectrode array, allowing the simultaneous determination of AA and UA by chronoamperometry [43] (Chapter 4).

The aim of the present work is to develop a portable sensor based on 4-ABA modified herringbone carbon nanotubes (hCNTs-4ABA) for the simultaneous quantification of AA and UA in human biological samples (i.e. urine, perspiration, serum and blood). To the best of our knowledge, this is the first time that hCNTs have been employed for the fabrication of electrodes to be used in portable devices for the simultaneous determination of AA and UA.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipment

Herringbone carbon nanotubes (hCNTs), uric acid ($\geq 99\%$, crystalline) and L-ascorbic acid (reagent grade, crystalline), glucose, dopamine hydrochloride, epinephrine, glutaraldehyde (50%), polytetrafluoroethylene (PTFE, 60 wt%) and dimethylformamide (DMF) were provided by Sigma-Aldrich. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) were obtained by Emsure[®] and Sigma-Aldrich respectively. Sulfuric acid (H_2SO_4 , 98%) was provided by AnalaR Normapur[®]. Perchloric acid (HClO_4 , 60%) was purchased from VWR Chemicals. Sodium hydroxide (NaOH) and 4-aminobenzoic acid (4-ABA) were purchased from Merck. Ultrapure water was obtained by a treatment in Purelab Ultra Elga with a resistivity of 18 M Ω cm.

Gold interdigitated microelectrodes array (Au-IDA) was provided by Micrux Technologies.

Transmission electron microscopic measurements (TEM) were carried out using a JEOL TEM, JEM-2010 model, which is equipped with an Oxford X-ray

detector (EDX), INCA Energy TEM 100 model, and GATAN acquisition camera.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements were performed using a VG-Microtech Multilab 3000 spectrometer using non-monochromatized MgK α (1253.6 eV) radiation from a twin anode source operated at 300 W (20 mA, 15 kV). Photoelectrons were collected into a hemispherical analyser working in the constant energy mode at a pass energy of 50 eV. The binding energy (BE) of the C1s peak at 286.4 eV was taken as internal standard.

Temperature programmed desorption (TPD) experiments were carried out in a DSC-TGA equipment (TA Instruments, SDT Q600) coupled to a mass spectrometer (Thermostar, Balzers, GSD 300 T3). The thermobalance was purged for 2 h under a helium flow rate of 100 mL min⁻¹ and then heated up to 950°C (heating rate 20°C min⁻¹).

2.2. Preparation of sensors

2.2.1. Electrochemical functionalization of hCNTs with 4-ABA

The WE was prepared from a paste of the hCNTs consisting of a mixture of hCNTs and PTFE as binder in a proportion 95:5 (w/w), respectively. A square-molded of the dried paste containing 25 mg and 1.5 cm² of this mixture was manually pressed and spread onto a graphite sheet collector to achieve an electrode with a uniform and thin hCNTs coating.

The functionalization of the hCNTs was performed in a three-electrode cell, using the WE prepared as mentioned above, a Pt wire as CE and a Ag/AgCl electrode as RE. Potentiodynamic functionalization was achieved by

submitting the sample to CV in a 0.1 M HClO₄ solution containing 1 mM of 4-ABA, where the potential was scanned between 0.5 and 1.4 V at 10 mV s⁻¹ during 10 cycles.

2.2.2. Functionalized hCNTs dispersion

Dispersions of 0.5 mg mL⁻¹ of hCNTs and hCNTs-4ABA were prepared in dimethylformamide (DMF) and water, respectively. To achieve a proper dispersion of the materials, an ultrasound probe was applied for 10 min. In order to avoid localized heating during sonication, the vessel containing the material suspension was immersed in an ice bath.

2.2.3. Preparation of modified electrodes

First, CV was performed in order to clean the Au-IDA. Ten cycles between -1.0 and 1.3 V vs gold pseudo-reference at 0.1 V s⁻¹ in 0.05 M H₂SO₄ were applied.

Then the Au-IDA was modified by casting the prepared dispersion on the microelectrodes array. Two different electrodes were modified, one with hCNTs dispersion and the other with the hCNTs-4ABA dispersion, leading in hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrodes, respectively. In all of them, the theoretical weight of the material deposited was 5 µg. The method for the deposition was the addition of 0.5 µL dropwise and let dry with the use of an infrared lamp. Finally, 1 µL of glutaraldehyde was added to improve the adhesion of the hCNTs on the support.

2.3. Electrochemical methods

All electrochemical measurements were carried out in a BIOLOGIC SP-300 potentiostat. A three-electrode configuration has been used, in which, the modified electrode was the WE, a Ag/AgCl electrode was the RE and the CE was a wire of Pt, which was wrapped around the RE. Two different configurations were established for the electrochemical measurement (Figure 5.1), which have been called vertical and horizontal configurations (or beaker-cell and drop-cell).

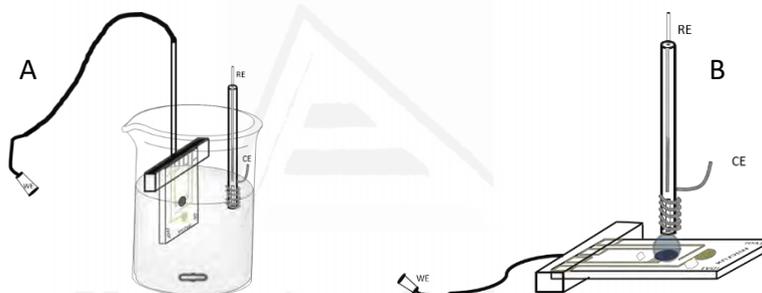


Figure 5.1. Schematic illustration of the proposed working configurations: A) Vertical configuration or beaker-cell. B) Horizontal configuration or drop-cell.

Figure 5.1A shows the vertical configuration, which uses a beaker containing 40 mL of the electrolyte, which was phosphate buffer solution (PBS 0.25 M, pH 7.0). In this configuration, stirring was kept at all times to ensure a good homogenization. The horizontal configuration, which is shown in Figure 5.1B, consists of a 40 μ L volume cell. Both configurations provide some advantages, especially with real samples analyses. The vertical configuration allows to work with more diluted samples, decreasing the matrix effects. On the other hand, the horizontal configuration allows the possibility to

measure human fluids like perspiration, whose collection in large quantities is complicated, and the AA and UA levels are low. The horizontal configuration enables low dilution of the samples with a small volume of sample. Thus, the configuration choice will depend on the characteristics of the sample (amount which is possible to collect and concentration of the analytes, among others).

Electrochemical behavior of the modified electrodes was evaluated towards AA and UA additions by CV in order to know at which potential the oxidation of AA and UA occurs. For this purpose, a concentrated AA and UA stock solutions (100 mM) were prepared in PBS, being the pH higher than 8.4 for UA solution. Four different aliquots from the stock solutions were added to the electrochemical cell (0.25 M PBS, pH 7.0) to reach the desired concentrations (50, 120, 420 and 600 μM). At this pH conditions, and according to the pK_a of the two analytes (pK_a (AA) = 4.2 [44]; pK_a (UA) = 5.2 [45]), the quantification of ascorbate monoanion (HA^-) and urate (HU^-) has been determined. However, these analytes will be referred to as AA and UA throughout the manuscript.

Afterward, CV was applied between -0.35 and 0.4 V, recording the signal.

Quantification of AA and UA was carried out by chronoamperometry at 0.1 V and 0.32 V, respectively. The chronoamperometric behavior of the electrodes was evaluated for concentrations between 0 and 1 mM of AA and UA, by the addition of seventeen aliquots for both analytes and by using both configurations (beaker and drop-cell). All measurements were carried out by triplicate in order to determine the analytical parameters.

For real samples determination, filtered and diluted human perspiration and human urine were used and no other treatment was carried out. Diluted blood and serum samples were also evaluated.

3. Results and discussion

3.1. Material characterization

Firstly, structural characterization of the hCNTs and hCNTs-4ABA materials was performed. Figure 5.2A and Figure 5.2B show the TEM images obtained for hCNTs and hCNTs-4ABA, respectively. It can be observed that there are not differences between both carbon materials. The TEM analysis shows that the hCNTs display a typical herringbone structure, which provides them with a larger number of graphitic edges on their surface [12,13]. The diameter of the CNTs is between 10 and 30 nm, which is included in the common range for carbon nanotubes [12].

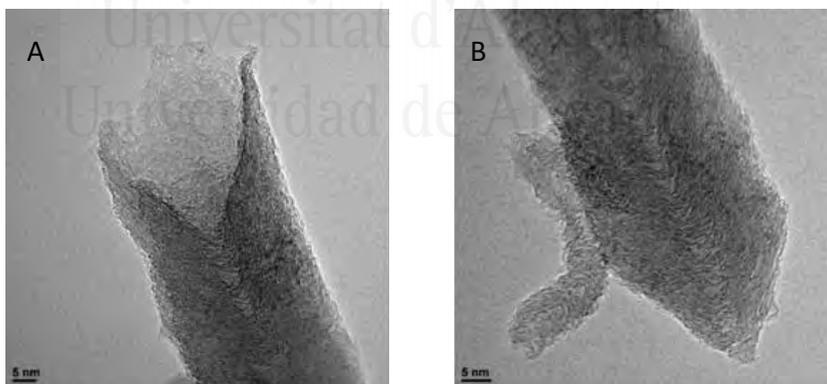


Figure 5.2. TEM images of: A) hCNTs material showing the open end of the CNT. B) hCNTs-4ABA material showing the close end of the CNT.

The electrochemical behavior of the modified electrodes (hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA) was investigated by CV in PBS (Figure 5.3).

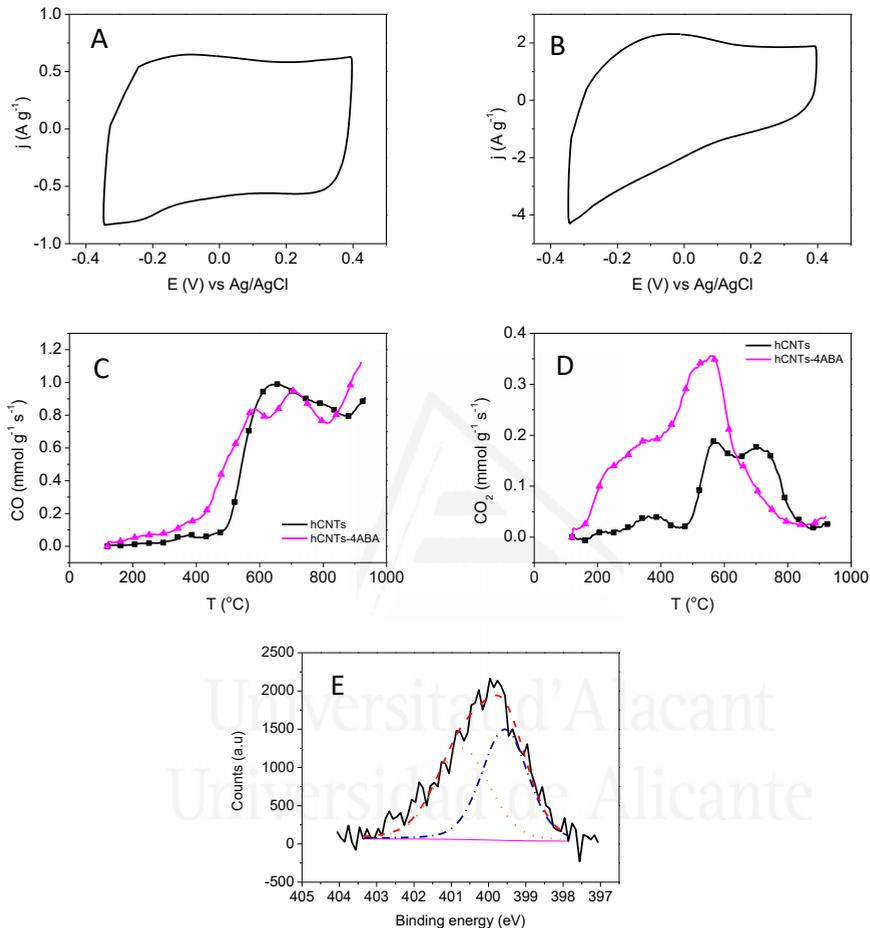


Figure 5.3. A-B) Steady voltammograms of: A) h-CNTs/Au-IDA. B) h-CNTs-4ABA/Au-IDA electrodes. Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. C-D) TPD profiles for hCNTs and hCNTs-4ABA: C) evolved CO. D) Evolved CO_2 . E) $\text{N}1s$ XPS spectrum for hCNTs-4ABA.

Figure 5.3A and Figure 5.3B depict the voltammograms registered between -0.35 and 0.4 V at a scan rate of 0.1 V s^{-1} for both electrodes. As it can be observed in Figure 5.3A, the voltammogram of hCNTs-4ABA/Au-IDA displays a rectangular shape, showing a capacitive behavior [46]. Figure 5.3B shows

the voltammogram obtained for the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. As it can be seen, the functionalization with 4-ABA leads in a loss of rectangular shape and the presence of a broad redox process between -0.35 and 0.1 V, corresponding to the 4-ABA functionalities attached to the carbon surface. The functionalization increases the capacitance of the material from 6.5 F g⁻¹ (hCNTs) to 21.1 F g⁻¹ (hCNTs-4ABA) and also produces an increase of the ability of the material to be dispersed in several solvents, including aqueous solutions, thus avoiding the use of organic solvents. Furthermore, the functionalization may enhance the electrocatalysis to different reactions due that the oxidation process could increase the edge-plane sites [12,13]. The surface composition of the materials was determined by XPS. The functionalized hCNTs show an increase in the oxygen and nitrogen content compared to the pristine hCNTs, thus decreasing the carbon content (from 99.8 at.% to 83.5 at.%). These results were expected due to the nature of the molecules attached to the hCNTs. The oxygen content increases from 0.2 at.% to 14.2 at.%, which is related to the presence of the carboxylic group in the 4-ABA and also to the oxidation of the hCNTs, as a consequence of the high potential used during the functionalization process. A 2.3 at.% of nitrogen was found in the functionalized sample due to the introduction of 4-ABA molecule, which contains the amino groups in its structure. The N1s spectrum (Figure 5.3E) displays a peak at 400 eV, which can be separated in two contributions, one at 399.5 eV assigned to neutral amines, and a second at 400.7 eV assigned to positively charged amines [47]. This result points out that the functionalization was done through the formation of secondary amine species via C-N bonding to the surface of the carbon nanotube [48]

or by the formation of short chain oligomers from the linkage of several aminoacids molecules [49].

The formation of different surface oxygen and nitrogen groups was also studied by TPD (Figure 5.3C and Figure 5.3D). The use of this technique allows to study the presence of different oxygen functional groups in the carbon surface. The CO and CO₂ evolution profiles are shown in Figure 5.3C and Figure 5.3D. The CO desorption profile for original hCNTs shows a large peak starting at 600°C, which could be associated with the carbothermal reduction of the metal catalyst remaining that was used during the synthesis of the hCNTs. In contrast, the CO evolution for hCNTs-4ABA appears in all temperature range. The desorption peak at temperatures lower than 600°C can be attributed to the presence of anhydride groups, and also the formation of CO-evolving functionalities, which it is known to occur during electrochemical oxidation of carbon materials [50]. The CO₂-TPD profile for the original hCNTs shows a CO₂ desorption from 400 to 800°C, which can be related to the presence of anhydrides (400-600°C) and lactones (600-800°C). On the other hand, the functionalized sample displays a broad peak, starting at low temperatures. Previous studies showed that the 4-ABA functionalities decomposed thermally at about 400-500°C, leading to a CO₂ desorption associated with decomposition of the carboxylic group present in the 4-ABA molecule [51]. The CO and CO₂ TPD profiles confirm the presence of a higher amount of oxygen groups for the functionalized materials (1940 μmol g⁻¹ s⁻¹ compared to 1450 μmol g⁻¹ s⁻¹), which are from different nature than the initial ones. Anhydrides and lactones are found for the hCNTs, whereas carboxylic groups are the most predominant in the hCNTs-4ABA material.

3.2. Voltammetric behavior towards AA and UA oxidation

3.2.1. Individual quantification of AA and UA

Electrochemical behavior of hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA electrodes towards AA and UA oxidation was evaluated by CV, by using the vertical configuration (beaker-cell). Figure 5.4 presents the voltammetric behavior achieved with both electrodes for different AA and UA concentrations.

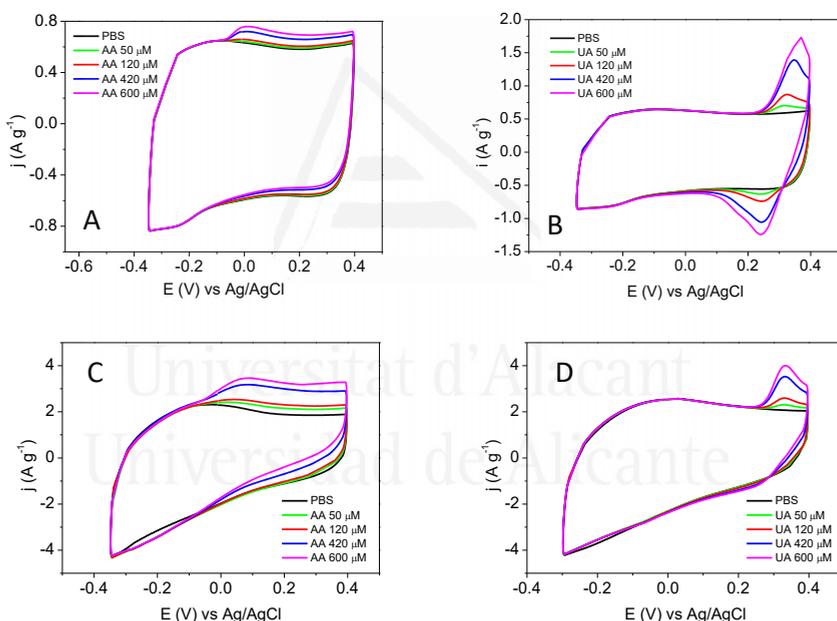


Figure 5.4. Voltammetric behavior of: A-B) hCNTs/Au-IDA electrode towards additions of: A) AA. B) UA. C-D) hCNTs-4ABA/Au-IDA towards: C) AA. D) UA. Vertical configuration: Electrolyte: PBS (0.25 M, pH 7.0).

Figure 5.4A shows the voltammograms obtained with the hCNT/Au-IDA electrode for the successive additions of AA, being the peak current at 0.015 V related to its oxidation. The voltammetric study of the hCNTs/Au-IDA electrode towards the additions of UA can be seen in Figure 5.4B. The peak

related to UA oxidation appears at 0.32 V, but the most remarkable fact is the peak that appears at 0.24 V belonging to the reduction process of UA, which is much smaller when the analysis is performed with hCNT-4ABA/Au-IDA electrode (Figure 5.4D).

Figure 5.4C exhibits the voltammograms obtained with hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode for successive additions of AA reaching concentrations between 50 and 600 μM . As it can be seen an anodic current related to the oxidation of AA appears at 0.085 V. Figure 5.4D presents the voltammograms obtained with this electrode for different concentrations of UA, whose oxidation takes place at 0.32 V. The results obtained with hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA electrodes are summarized in Table 5.1 and Table 5.2, respectively. The calibration curves are not shown.

Comparing the voltammetric behavior towards UA oxidation with both electrodes, it seems that the interaction between UA and the carbon surface is stronger with the functionalized hCNTs, resulting in a more irreversible reaction. That may be ascribed to the hydrophilic groups incorporated during the functionalization process. Functionalization of carbon materials with nitrogen compounds can further improve the reactivity and electrocatalytic activity of the material by forming a delocalized conjugated system with the sp^2 -hybridised carbon frameworks attributed to the lone electron pairs of nitrogen atoms. At the same time, nitrogen doping provides a large number of sites where the AA or UA can be attached by hydrogen bonds, which may activate the amine groups and accelerate the charge transfer between UA and the carbon material [52,53]. The oxygen-containing functional groups, which have been generated during the

functionalization, also enhance the surface energy and facilitate more binding sites [31,54,55], where AA and UA may be attached. As a result, an enhanced sensitivity towards the quantification of AA and UA is obtained after the functionalization of hCNTs.

Table 5.1. Figures of merit for the AA and UA voltammetric determination by the hCNTs/Au-IDA modified electrode.

Parameter	AA study		UA study	
	AA	AA +UA (C _{UA} = 600 μM)	UA	UA+AA (C _{AA} = 600 μM)
Sensitivity (A g ⁻¹ mM ⁻¹)	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.02	1.7 ± 0.6	1.4 ± 0.7
Intercept (A g ⁻¹)	(2 ± 3)·10 ⁻⁴	(2 ± 2)·10 ⁻³	0.03 ± 0.12	0.03 ± 0.14
r	0.9999	0.998	0.991	0.984
N	5	5	4	4
Linear range (μM)	0-600	0-600	0-420	0-420
LOD (μM)	15	15	15	15
LOQ (μM)	50	50	50	50

Table 5.2. Figures of merit for the AA and UA voltammetric determination by the hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrode.

Parameter	AA study		UA study	
	AA	AA +UA ($C_{UA} = 600 \mu\text{M}$)	UA	UA+AA ($C_{AA} = 600 \mu\text{M}$)
Sensitivity ($\text{A g}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	2.3 ± 0.4	1.042 ± 0.007	3.2 ± 0.4	3.00 ± 0.14
Intercept (A g^{-1})	0.08 ± 0.13	$(0 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	0.1 ± 0.4	0.01 ± 0.05
r	0.994	0.9999	0.997	0.9996
N	5	5	5	5
Linear range (μM)	0-600	0-600	0-600	0-600
LOD (μM)	15	15	15	15
LOQ (μM)	50	50	50	50

3.2.2. Simultaneous quantification of AA and UA

On the other hand, in order to study the simultaneous quantification of AA and UA, CV was applied. The voltammetric study was performed by using hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA electrodes, being both able to provide different peaks for AA and UA oxidation. The results are presented in Figure 5.5 and Figure 5.6. Figure 5.5A and Figure 5.5B show the voltammograms obtained with hCNTs/Au-IDA electrode for the successive additions of AA and UA, with fixed concentrations of UA and AA, respectively. Figure 5.5A displays the voltammograms for a fixed UA concentration ($C_{UA} = 600 \mu\text{M}$) and the successive additions of AA with concentrations between 50 and 600 μM , while Figure 5.5B shows the

behavior of the hCNTs/Au-IDA electrode towards the UA oxidation, with an initial concentration of 600 μM AA and successive aliquots of a UA stock solution added. It can be observed in both figures the presence of two oxidation peaks at around 0.1 V and 0.3 V when the two analytes are in the solution, corresponding to AA oxidation and UA oxidation, respectively.

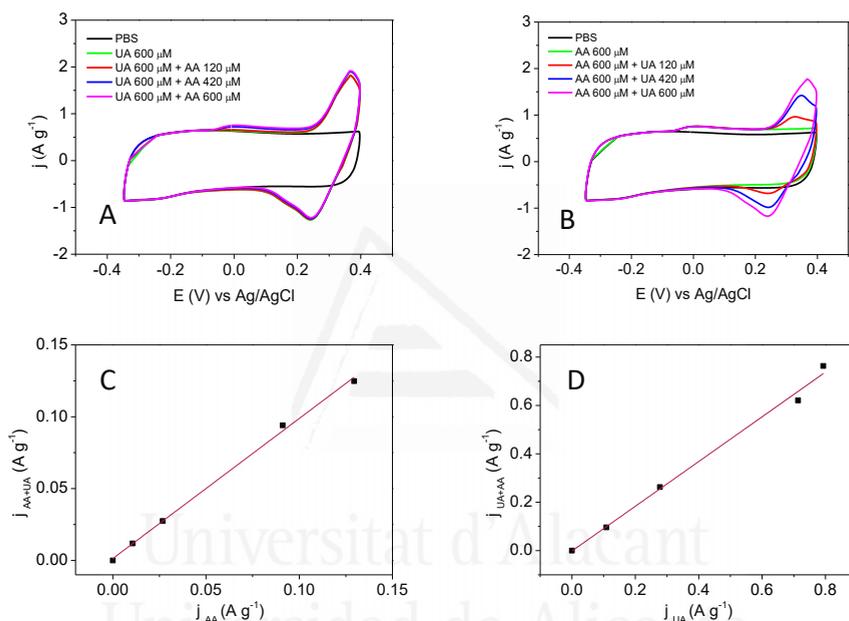


Figure 5.5. Voltammetric behavior of hCNTs/Au-IDA electrode in a solution that contains a mixture of AA and UA: A-B) voltammograms obtained in PBS (0.25 M, pH 7.0) and for different additions of: A) AA with a fixed UA concentration ($C_{\text{UA}} = 600 \mu\text{M}$). B) UA with a fixed AA concentration ($C_{\text{AA}} = 600 \mu\text{M}$). C-D) Regression lines of j_i vs j_{i+j} : C) j_{AA} vs $j_{\text{AA+UA}}$. D) j_{UA} vs $j_{\text{UA+AA}}$.

Figure 5.6A and Figure 5.6B show the voltammograms registered for the interference study performed with hCNTs-4ABA/Au-IDA. Figure 5.6A displays the voltammograms for a fixed UA concentration ($C_{\text{UA}} = 600 \mu\text{M}$) and the successive additions of AA with concentrations between 50 and 600 μM , while Figure 5.6B shows the behavior of the modified electrode

towards UA oxidation, with an initial concentration of 600 μM AA and successive aliquots of a stock UA solution added.

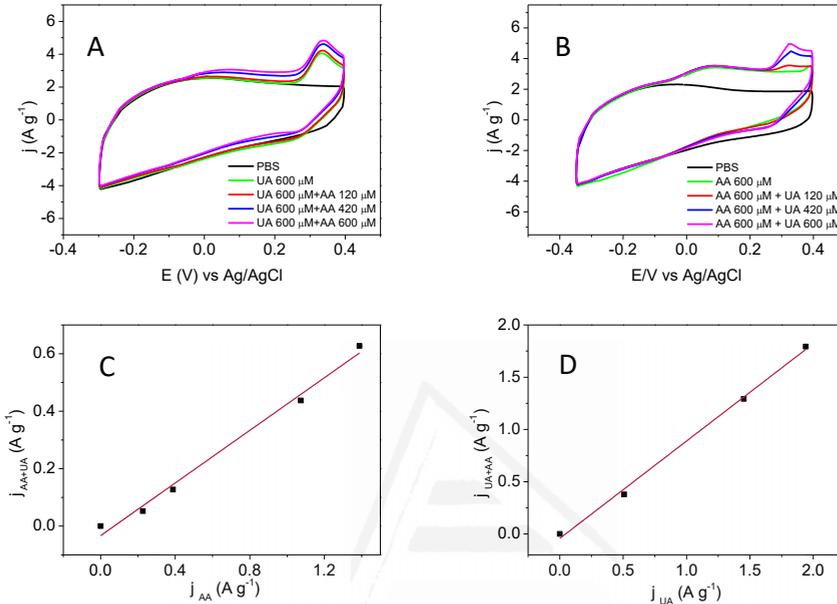


Figure 5.6. Voltammetric behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in a solution that contains a mixture of AA and UA: A-B) voltammograms obtained in PBS (0.25 M, pH 7.0) and for different additions of: A) AA with a fixed UA concentration ($C_{\text{UA}} = 600 \mu\text{M}$). B) UA with a fixed AA concentration ($C_{\text{AA}} = 600 \mu\text{M}$). C-D) Regression lines of j_i vs j_{Hj} : C) $j_{\text{AA+UA}}$ vs j_{AA} . D) $j_{\text{UA+AA}}$ vs j_{UA} . Vertical configuration.

As it can be checked in Figure 5.5 and Figure 5.6, the CV response shows for both electrodes two well-defined currents, which suggests that neither AA nor UA interfere in the voltammetric response of the other analyte. However, the voltammograms presented in Figure 5.5A and Figure 5.6A show an increase in the anodic current at 0.32 V, belonging to UA oxidation, when several aliquots of AA were added. The opposite behavior was observed in Figure 5.5B and Figure 5.6B, where it can be observed that several additions of aliquots of UA in a solution of AA 600 μM just lead to an

increase of the current corresponding to UA oxidation, showing no change in the anodic peak at 0.1 V.

Table 5.1 present all the figures of merit for the individual and simultaneous determination of AA and UA by hCNTs/Au-IDA electrode. As it can be seen in Table 5.1, the sensitivity obtained for UA is much higher than for AA, indicating a stronger interaction between UA and the carbon surface. Comparing the sensitivity values between individual and simultaneous determination, no significant differences were observed. Furthermore, Table 5.2 presents the results achieved with the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. Comparing the sensitivity values, no significant differences were observed between individual and simultaneous determination for UA quantification. However, the sensitivity value for AA measurement in the presence of UA sharply decreases, compared to the value obtained without UA. This result can be due to the high affinity towards UA of the hCNT-4ABA/Au-IDA electrode, which decreases the ability of the electrode to quantify AA when the sample has an elevated concentration of UA.

Nevertheless, in order to assess whether AA and UA interferes in the UA and AA measurements, a statistical test was applied. It involves plotting the results of the measurement of AA without UA in one of the axis (Y axis), and the results obtained with UA in the other axis (X-axis). If the results obtained with and without UA are the same, a straight line with a slope close to one and crossing the origin (intercept zero) will be obtained [56]. The same strategy is applied for the evaluation of AA as a possible interference of UA. Figure 5.5C and Figure 5.5D show the results obtained with hCNTs/Au-IDA electrode. The plot obtained for AA oxidation (Figure 5.5C) shows a good

correlation between both results in the presence and absence of UA. The linear equations obtained is shown in Equation 5.1 with a correlation coefficient of 0.999:

$$j_{AA+UA} (\text{A g}^{-1}) = (0.97 \pm 0.08) j_{AA} (\text{A g}^{-1}) + (0.001 \pm 0.006) \quad \text{Equation 5.1}$$

The statistical test applied, which allows to assess that AA does not interfere in the UA measurement is exhibited in Figure 5.5D, whose linear equation is next presented (Equation 5.2), where a correlation coefficient of 0.996 was obtained.

$$j_{UA+AA} (\text{A g}^{-1}) = (0.92 \pm 0.12) j_{UA} (\text{A g}^{-1}) - (0.00 \pm 0.06) \quad \text{Equation 5.2}$$

Then, it can be concluded that neither AA nor UA interfere with the voltammetric quantification of each other. Figure 5.6C and Figure 5.6D show the results reached with hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. Figure 5.6C exhibits a suitable correlation between both results in the presence and absence of UA. The linear equation obtained is (Equation 5.3):

$$j_{AA+UA} (\text{A g}^{-1}) = (0.46 \pm 0.08) j_{AA} (\text{A g}^{-1}) - (0.03 \pm 0.08) \quad \text{Equation 5.3}$$

with a correlation coefficient of 0.994. As it can be concluded from the linear equation, 2-fold sensitivity is obtained when only AA is in the mixture, and as a result, UA can be considered as an interference of AA. Presumably, UA is strongly adsorbed on the hCNT-4ABA surface and as a consequence, subsequent additions of AA do not imply the same voltammetric response than when only AA is in the mixture. This strong interaction between UA and the hCNTs-4ABA leads to a more irreversible process and the cathodic signal decreases in the reverse scan (Figure 5.5B and Figure 5.6B). Figure 5.6D shows the statistical test towards the UA voltammetric quantification. The linear equation obtained is (Equation 5.4):

$$j_{\text{UA+AA}} (\text{A g}^{-1}) = (0.93 \pm 0.12) j_{\text{UA}} (\text{A g}^{-1}) - (0.04 \pm 0.13) \quad \text{Equation 5.4}$$

with a correlation coefficient of 0.998. It can be concluded from the linear equation that AA does not interfere in the UA quantification by using the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode.

If the voltammetric behavior of the hCNTs/Au-IDA and hCNTs-4ABA/Au-IDA electrodes towards a mixture of both analytes is compared (Table 5.1 and Table 5.2), enhanced sensitivities have been obtained with hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode, pointing out the suitable interaction of AA and UA with the hydrophilic groups attached to the hCNTs surface. Therefore, the electrode selected for the development of the method for the simultaneous quantification of AA and UA has been the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. However, the interference of AA upon UA should be addressed.

3.3. Chronoamperometric behavior towards AA and UA determination

3.3.1. Individual determination of AA and UA

The individual quantification of AA and UA, as a result of the voltammetric evaluation, was performed by chronoamperometry at 0.1 V and 0.32 V potentials using vertical and horizontal configuration (beaker-cell and drop-cell, respectively).

The j - t curves registered by vertical configuration are presented in Figure 5.7A for AA and Figure 5.7B for UA. Chronoamperometries were performed for AA and UA concentrations between 0 and 1 mM. Figure 5.7C and Figure 5.7D show the calibration curves obtained for both analytes.

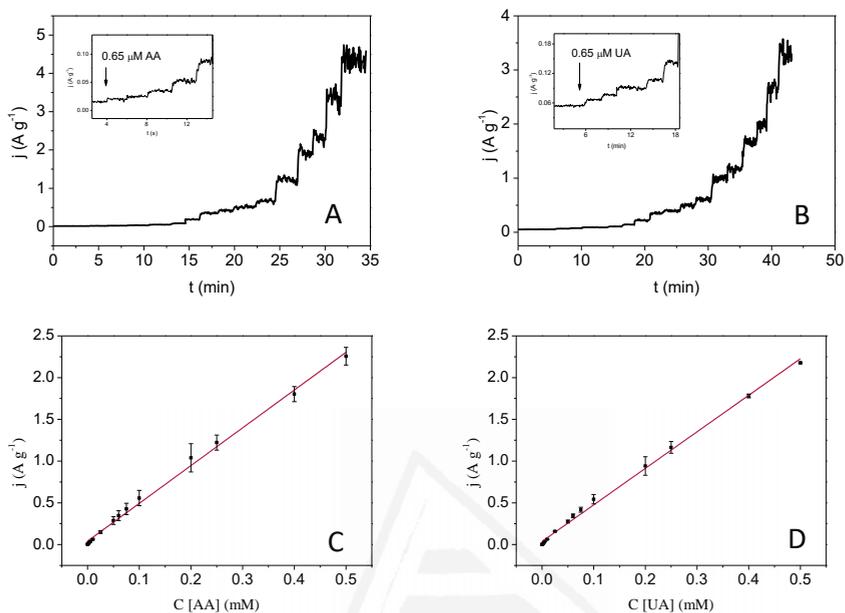


Figure 5.7. Electrochemical behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA and UA oxidation in vertical configuration: A-B) j - t curves for concentrations between 0 and 1 mM of: A) AA at 0.1 V. B) UA at 0.32 V. $E_i = 0.0$ V. C-D) Calibration curves obtained for: C) AA. D) UA.

Chronoamperometries at 0.1 V and 0.32 V were also performed by using the horizontal configuration (drop cell). The j - t curves obtained for AA and UA are presented in Figure 5.8A and Figure 5.8B, respectively, whose calibration curves are shown in Figure 5.8C (AA) and Figure 5.8D (UA).

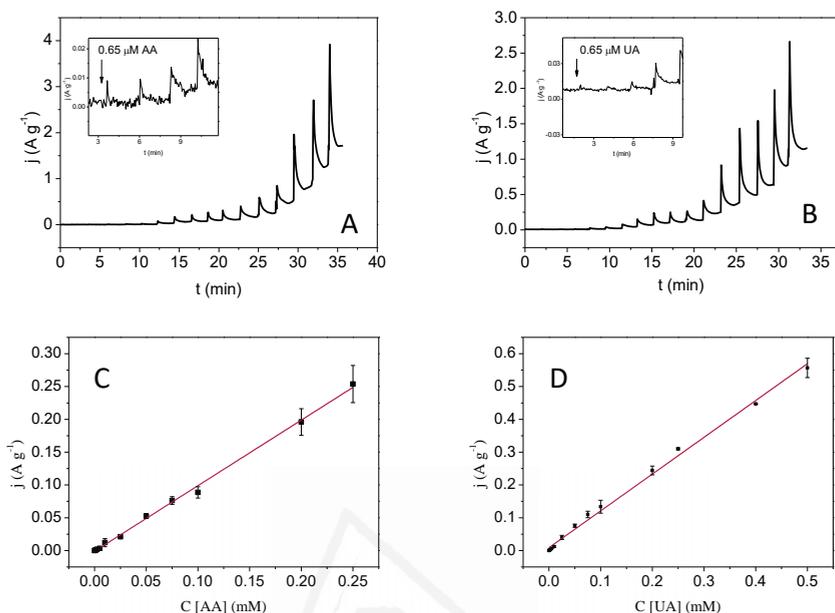


Figure 5.8. Electrochemical behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA and UA oxidation in horizontal configuration: A-B) j-t curves for concentrations between 0 and 1 mM of: A) AA at 0.1 V. B) UA at 0.32 V. $E_i = 0.0$ V. C-D) Calibration curves obtained for: C) AA. D) UA.

All figures of merit calculated for the quantification of AA and UA are summarized in Table 5.3. The LOD was determined empirically, progressively measuring more diluted concentrations of the analyte. The LOD was the lowest concentration whose signal could be clearly distinguished from the blank. Moreover, the LOQ was calculated as 3.3 times the LOD (LOQ = 3.3LOD). Additionally, the RSD values were obtained for 3 replicates at 50 μM concentration level of AA and UA [56].

Table 5.3. Figures of merit for the chronoamperometric quantification of AA and UA by the hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrode.

Parameter	Beaker-cell		Drop-Cell	
	AA	UA	AA	UA
Sensitivity (A g ⁻¹ mM ⁻¹)	4.5 ± 0.2	4.38 ± 0.14	1.00 ± 0.03	1.12 ± 0.04
Intercept (A g ⁻¹)	(4 ± 3)·10 ⁻²	(4 ± 3)·10 ⁻²	(-1 ± 3)·10 ⁻³	(9 ± 9)·10 ⁻³
R	0.998	0.996	0.999	0.998
N	14	14	12	14
Linear range (μM)	0-500	0-500	0-250	0-500
LOD (μM)	0.65	0.65	0.65	0.65
LOQ (μM)	2.1	2.1	2.1	2.1
RSD (%) (n = 3; 50 μM)	8	6	7	6

As it can be concluded from the results presented in Table 5.3, both developed cells provide suitable analytical parameters for the quantification of AA and UA in human fluids.

3.3.2. Evaluation of interferences

The concentrations of AA and UA studied in the voltammetric experiments were higher than the established levels in human fluids for healthy people, hence amperometric responses for minimum and maximum levels of AA and UA usually found in physiological fluids were evaluated to have a broad knowledge about how analytes interfere each other. Moreover, the possible interference of other compounds that usually coexist in

physiological fluids has been evaluated. In order to simulate real serum samples, concentrations of these compounds usually found in human serum, or even higher, were evaluated. For that purpose, concentrations of UA between 120 and 420 μM [1,2,57], AA between 30 and 90 μM [5,44,58], 5 mM glucose [59], 1 μM DP [60,61] and 0.5 μM EP [62,63] were studied. Figure 5.9 displays the *i-t* curves recorded for the interferences study.

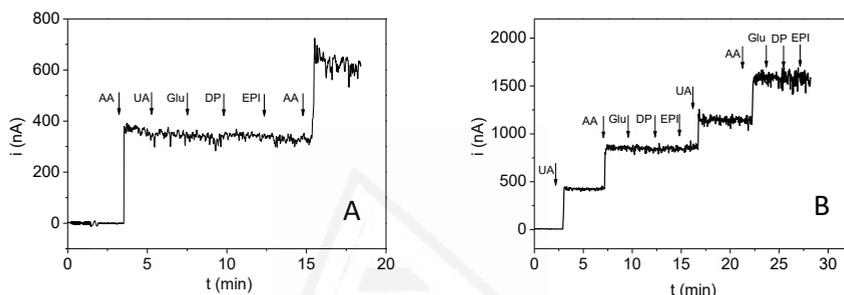


Figure 5.9. *i-t* curves obtained for successive additions of: A) AA (30 μM), UA (420 μM), glucose (5 mM), DP (1 μM), EP (0.5 μM) and AA (60 μM) at $E_f = 0.1$ V. B) UA (120 μM), AA (30 μM), glucose (5 mM), DP (1 μM), EP (0.5 μM) and repeated two times at $E_f = 0.32$ V. $E_i = 0.0$ V.

Figure 5.9A allows to assess that the addition of UA (420 μM), glucose (5 mM), DP (1 μM) and EP (0.5 μM) do not change the current at 0.1 V, while the addition of AA (30 μM and 60 μM) leads to an increase in the current of the signal registered. Therefore, it can be concluded that UA, glucose, DP and EP do not interfere in the determination of AA. Figure 5.9B exhibits the *i-t* curve obtained for the successive additions of UA (120 μM and 240 μM), AA (30 μM and 60 μM), glucose (5 mM), DP (1 μM) and EP (0.5 μM) at 0.32 V. As it can be observed in Figure 5.9B, neither glucose, DP, nor EP, at the concentration level studied, interfere on the measurement of UA at 0.32 V. However, additions of AA imply an increase in the signal at the potential at

which UA is oxidized. As a result, it can be concluded that AA is interfering in the measurement of UA.

In order to apply the method for the quantification of UA in the presence of AA in physiological samples, a simple strategy may be followed: calibration curve of AA at 0.1 V and calibration curve of UA containing the amount of AA in the real sample at 0.32 V. The real sample, which contains a mixture of AA and UA will be subjected to two chronoamperometries, at 0.1 V and 0.32 V. The j - t curve at 0.1 V will provide a current ($j_{AA,1}$), which is directly related to the concentration of AA (C_{AA}) by the linear function of calibration curve 1. From the j - t curve at 0.32 V, a second current ($j_T = i_{AA,2} + i_{UA}$) will be obtained. Then, the amount of UA in the sample can be quantified by using the linear function of calibration curve 2, which has been made with the amount of AA that was present in the real sample.

As it was found that the presence of AA interferes in the chronoamperometric measurement of the UA concentration, chronoamperometry at 0.32 V for successive additions of UA with a known AA concentration was performed. The study was performed for two AA concentration levels: 4 μ M and 8 μ M. The concentration levels were selected in order to simulate the AA concentration in the real samples analysed in the present work. Figure 5.10 shows the calibration curve obtained for concentrations of UA up to 0.5 mM with an AA concentration of 4 μ M and by using vertical configuration (Figure 5.10A), and a concentration of 8 μ M AA and by using horizontal configuration (Figure 5.10B). Also, the configuration choice was done taking into account the UA

concentration levels usually found in the analysed samples and the amount of sample collected.

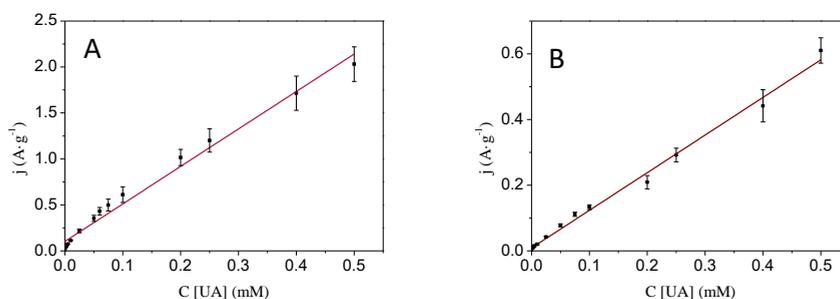


Figure 5.10. A) Calibration curve for UA in the presence of AA 4 μ M. Vertical configuration. B) Calibration curve for UA in the presence of AA 8 μ M. Horizontal configuration.

Table 5.4 exhibits the figures of merit calculated from the above calibration curves. In order to evaluate the effect of the presence of AA Table 5.4 also provides the analytical parameters obtained without AA. As it can be checked in Table 5.4, no significant differences can be found between the results obtained for the measurement of only UA and the results when AA is in the mixture, both vertical and horizontal configuration. The reason why AA does not interfere is because of its low concentration. If an elevated AA concentration would be evaluated a calibration curve with the same slope and a higher intercept will be obtained. Only if the AA concentration is high enough that the electrode surface is saturated, a decrease in the slope will be observed.

Table 5.4. Figures of merit for the determination of UA in a solution of UA and in a mixture of UA and AA.

Parameter	Beaker-cell		Drop Cell	
	UA	UA+AA (4 μ M AA)	UA	UA+AA (8 μ M AA)
Sensitivity (A g ⁻¹ mM ⁻¹)	4.38 \pm 0.14	4.1 \pm 0.3	1.12 \pm 0.04	1.15 \pm 0.05
Intercept (A g ⁻¹)	0.04 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05	(9 \pm 9)·10 ⁻³	(9 \pm 10)·10 ⁻³
r	0.996	0.993	0.998	0.997
N	14	14	14	14
Linear range (μ M)	0-500	0-500	0-500	0-500
LOD (μ M)	0.65	0.65	0.65	0.65
LOQ (μ M)	2.1	2.1	2.1	2.1
RSD (%) (n = 3; 50 μ M)	6	9	6	6

Finally, Table 5.5 shows a comparison of some analytical parameters obtained in this work with others results previously reported. It can be concluded after checking several works that the developed electrochemical and portable sensor exhibits outstanding sensitivities, representing therefore, a suitable and competitive alternative for the simultaneous quantification of AA and UA.

Table 5.5. Comparison of analytical characteristics for several electrochemical AA and UA sensors.

Electrode	AA		UA		Real sample	Ref.
	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)		
CNTs-PAM	-	-	5.433	1.0	Urine Serum (E.C.) ^a	[24]
MWCNT/ poly-VA	0.0625	3.5	0.080	1.5	Urine (E.C.)	[27]
[Ni(phen) ₂] ₂ - SWCNTs/ GCE	0.0487	12	0.0301	0.76	Tablets Urine (S.A.) ^b	[28]
B- MWCNTs	-	1.21	-	0.65	-	[31]
N-MWCNTs /AuNPs	-	0.9	-	0.4	Urine (S.A.)	[32]
GO/CNT/ sCS/GCE	0.72 cm ⁻²	0.06	0.96 cm ⁻²	0.05	no	[34]
Pt-Gr- CNT/GCE	0.186 cm ⁻²	50	9.386 cm ⁻²	0.1	Tablets Urine Serum (E.C.) Rat	[64]
MWCNT/ GCE	-	-	1.078	1	serum (E.C.)	[65]
rGO/GCE	5.39·10 ⁻³	300	0.520·10 ⁻³	0.5	Urine (E.C)	[66]

Table 5.5. Comparison of analytical characteristics for several electrochemical AA and UA sensors (continuation).

Electrode	AA		UA		Real sample	Ref.
	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	LOD (μM)		
Au-GO/Au- IDA	$(0.830 \pm 0.060) \cdot 10^{-3}$	1.4	$(0.728 \pm 0.016) \cdot 10^{-3}$	0.62	Urine (S.A.)	C.4 ^c
hCNTs- 4ABA/Au- IDA	4500 ± 200 (g^{-1})	0.65	4380 ± 140 (g^{-1})	0.65	Serum Blood Urine Sweat (E.C.)	This work

^aE.C.: External calibration method.

^bS.A.: Standard addition method.

^cC.4: Results shown in Chapter 4.

3.4. Real samples

3.4.1. Urine samples

Human urine was collected from five volunteers (3 males and 2 females) with ages between 26 and 38 years. Just one of the volunteers (Subject V) was diagnosed with kidney stones. Urine was filtered and diluted before its measurement and no other treatment was carried out. The determination of both AA and UA was accomplished by using the external calibration curve performed in PBS (Figure 5.7D and Figure 5.8D). The behavior of the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA and UA determination in urine was investigated, first of all, by CV. The results obtained can be observed in Figure 5.11.

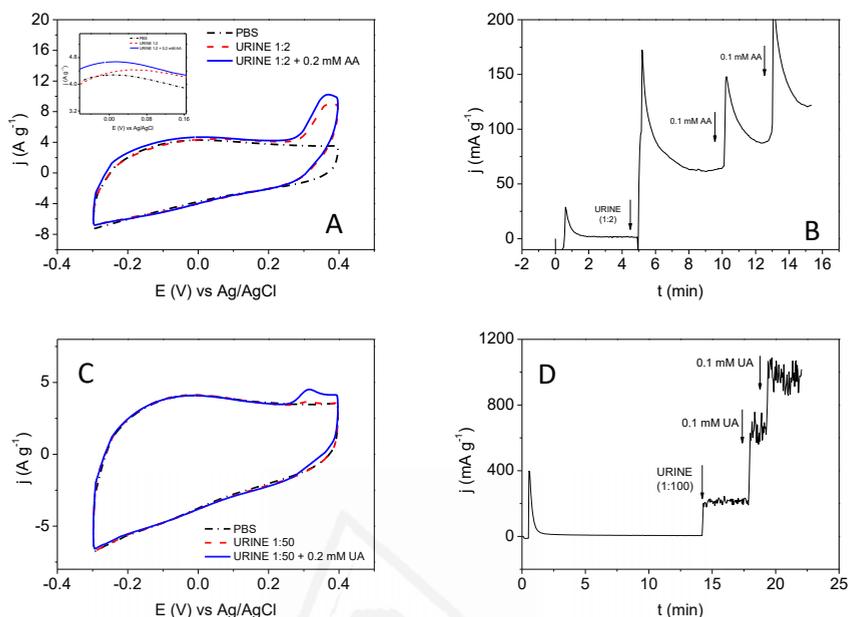


Figure 5.11. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real urine samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed by using drop-cell (horizontal configuration) in: PBS (dash-dotted line), diluted urine (1:2) (dashed line), diluted urine with 0.2 mM AA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 V s^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted urine (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0 V$. C-D) UA quantification by: C) CV performed by using beaker-cell (vertical configuration) in: PBS (dash-dotted line), diluted urine (1:50) (dashed line), diluted urine with 0.2 mM UA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 V s^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted urine (1:50) and 0.1 mM UA (2 times). $E_i = 0.0 V$.

After that, chronoamperometries at 0.1 V and 0.32 V were applied in order to quantify the amount of AA and UA in the urine samples. For the quantification of AA, which concentration is much lower, the horizontal configuration was applied, while the measurement of the concentration level of UA was performed by using vertical configuration. Figure 5.11A shows the voltammograms obtained by using the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in the horizontal configuration in a PBS solution (dash-dotted line), in the urine sample diluted 2 times (dashed line) and the diluted urine

sample with 200 μM of AA reached (solid line). As it can be observed in the voltammogram belonging to diluted urine (Figure 5.11A, dashed line), an anodic peak at 0.37 V may be ascribed to the UA oxidation. The peak related to the oxidation of AA is difficult to be observed in the voltammogram because the concentration of AA in urine is much lower than UA concentration. However, a slight difference between voltammograms at around 0.08 V is seen, which may be related to the oxidation reaction of AA (Inset of Figure 5.11A). The subsequent addition of 200 μM AA leads to an increase in the signal at 0.08 V, verifying that this current is related to this analyte. The use of the drop-cell allows to work diluting just twice with only 20 μL of the urine sample. Figure 5.11C exhibits the voltammograms obtained by using hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in the vertical configuration in a PBS solution (dash-dotted line), in the urine sample diluted 50 times (dashed line) and the diluted urine sample with 200 μM UA added (solid line). As it can be noted in Figure 5.11C, the current related to the oxidation of AA is not observed because of the high dilution effect. However, the current belonging to UA oxidation can be observed at 0.32 V. Figure 5.11B presents the j-t curve registered at 0.1 V showing the effect of the addition of human urine (dilution 1:2) and two different concentrations of AA from a stock solution. Figure 5.11D exhibits the j-t curve performed at 0.32 V, where it can be seen the rising in the current after the addition of diluted urine (1:50) and aliquots from a stock solution of UA. The concentrations of AA and UA calculated in urine sample can be found in Table 5.6.

It has to be noted that the addition of known concentrations of AA and UA (Figure 5.11) allows calculating the trueness of the method, whose recovery values should be between 80 and 120%, ensuring the quality of the measurement. As it can be check in Table 5.6, all the recoveries calculated, for both AA and UA, are included in the established range, indicating the high accuracy of the developed method.

Table 5.6. Determination of AA and UA in real urine samples.

Subject/ Analyte	Dil.	C _{sample} ^a (μ M)	Spiked (mM)	Found ^b (mM)	Recov. (%) ^c
I	AA	1:2	0.1	0.102 \pm 0.011	93 \pm 15
			0.2	0.204 \pm 0.011	98 \pm 6
	UA	1:50	0.1	0.160 \pm 0.013	95 \pm 12
			0.2	0.195 \pm 0.011	83 \pm 2
II	AA	1:2	0.1	0.177 \pm 0.013	116 \pm 15
			0.2	0.320 \pm 0.013	112 \pm 19
	UA	1:50	0.1	0.112 \pm 0.011	91 \pm 14
			0.2	0.185 \pm 0.011	82 \pm 15
III	AA	1:2	0.1	0.116 \pm 0.011	82 \pm 10
			0.2	0.220 \pm 0.011	91 \pm 11
	UA	1:100	0.1	0.098 \pm 0.011	94 \pm 5
			0.2	0.183 \pm 0.011	90 \pm 3
IV	AA	1:2	0.1	0.13 \pm 0.02	103
			0.2	0.22 \pm 0.02	98
	UA	1:100	0.1	0.10 \pm 0.02	90 \pm 8
			0.2	0.18 \pm 0.02	85 \pm 10
V	AA	1:2	0.1	0.274 \pm 0.014	92 \pm 2
			0.2	0.375 \pm 0.014	94 \pm 3
	UA	1:100	0.1	0.12 \pm 0.02	97 \pm 14
			0.2	0.21 \pm 0.02	92 \pm 13

^a The concentration of the analyte in the sample taking into account the dilution applied.

^{b,c} Error calculated by confidence interval.

The average value of the AA excreted by urine has been established in 34 mg in 24 hours [67] or 132 μM (based on a 1.5 L total urine volume in 24 hours). However, the concentration of AA in urine samples reflects recent intakes of vitamin C [68], and can be changeable, which justify the differences between the AA levels calculated above. Nevertheless, the AA concentration in the urine sample collected from Subject V is much higher than the others. This elevated AA concentration may be ascribed to the kidney stones disease that Subject V was diagnosed. These kidney stones are basically oxalic acid, which are produced when the concentration of AA is elevated [69].

Table 5.6 also exhibits the UA concentration calculated for all Subjects. It is important to mention that in the most of the samples, because of its dilution, the AA concentration was lower than the LOD or LOQ achieved with hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. As a result of the low AA concentration, the calibration curve obtained for UA by vertical configuration was employed (Figure 5.7D) for determining the concentration of UA. However, the AA concentration in the sample collected from Subject V, even when the dilution of the sample is 1:100, is higher than the LOQ ($\text{LOQ} = 2.1 \mu\text{M} < C_{\text{AA,V}}$ (diluted 1:100) = 3.99 μM). For that reason, a calibration curve of UA by using vertical configuration and with an AA concentration of 4 μM was performed, in order to be able to determine the UA concentration in the urine sample V (Figure 5.10A and Table 5.4).

As it can be checked in Table 5.6, the UA levels determined are included in the healthy concentration range, which has been established between 1.4 and 4.7 mM or 200 and 2000 mg/24 h [70,71]. Additionally, the urine sample

from Subject V was used for the evaluation of the inter-sensor reproducibility by using four different sensors, providing a RSD of 7%. Figure 5.12 shows the concentrations of UA measured with each electrode.

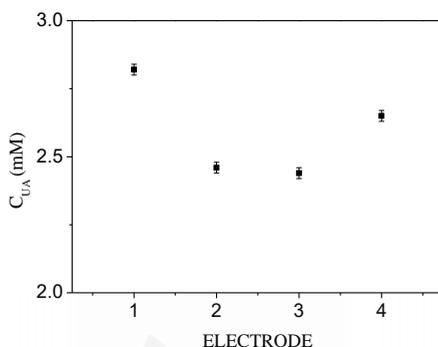


Figure 5.12. Inter-sensor reproducibility studied on urine sample (dilution 1:100) with four electrodes. Electrodes used: hCNTs-4ABA/Au-IDA.

3.4.2. Perspiration samples

Perspiration samples from Subjects I-V were collected after a hard sport session. Perspiration samples were filtered and diluted 1.3 and 2 times for AA and UA measurement, respectively. Those dilutions were chosen due to the low concentration of AA and UA in perspiration samples, to the difficulty to collect this sort of fluids and because a dilution is mandatory due to the method has been developed by adding the analyte aliquots after a PBS steady current was reached. Both analyses were performed by using the horizontal configuration. The behavior of the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards the AA and UA quantification in perspiration samples was evaluated by CV and chronoamperometry (Figure 5.13). External calibration curves were employed for the determination of the concentration of AA and UA in all the samples.

Figure 5.13 shows the voltammetric and chronoamperometric behaviour of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards human perspiration samples. Figure 5.13A and Figure 5.13B are related to the AA oxidation in perspiration samples, while Figure 5.13C and Figure 5.13D exhibit the results obtained for the UA oxidation.

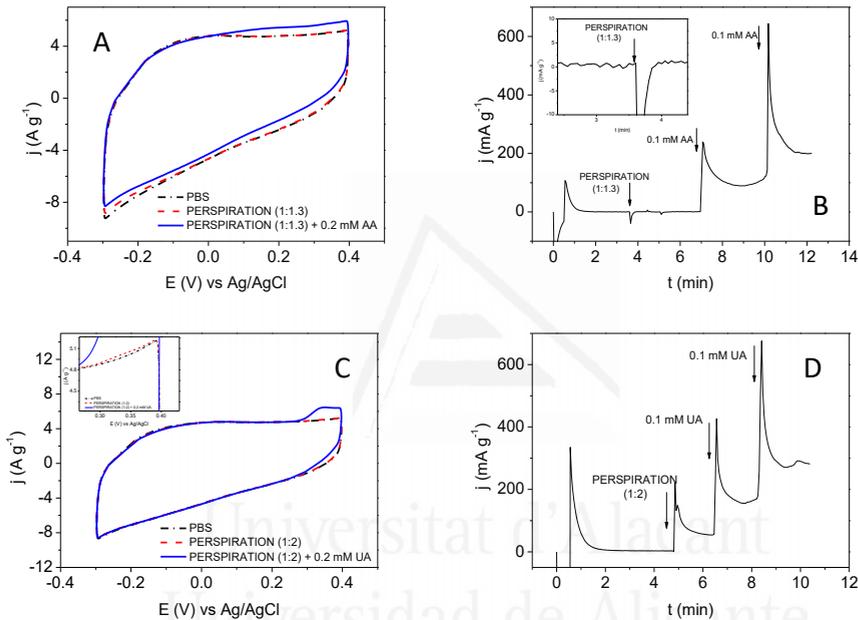


Figure 5.13. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real perspiration samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS ((dash-dotted line)), diluted perspiration (1:1.3) (dashed line), diluted perspiration with 0.2 mM of AA added (solid line). $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted perspiration (1:1.3) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$. Inset: Magnification of the j-t curve. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted perspiration (1:2) (dashed line), diluted perspiration with 0.2 mM of UA added (solid line). Inset: Magnification of the voltammogram. $v_{\text{scan}} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted perspiration (1:2) and 0.1 mM UA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$. All the analyses have been performed by using the drop-cell (horizontal configuration).

Figure 5.13A exhibits the voltammograms obtained with the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in PBS and after the addition of the diluted

perspiration and an aliquot of a stock solution of AA. As it can be observed, no differences in the voltammogram were found after the addition of the perspiration sample. However, the subsequent addition of 200 μM of AA showed an increase in the current, which begin at around 0.0 V. Chronoamperometry at 0.1 V was performed and the j-t curve registered can be seen in Figure 5.13B, which Inset shows a magnification of the j-t curve at the time when the perspiration sample was added. As it can be observed, the addition of the sample implies a slight increment in the current. However, AA concentration levels are clearly lower in this sort of physiological fluids.

Figure 5.13C displays the voltammograms obtained in PBS and after the addition of the diluted perspiration and an aliquot of a stock solution of UA. The Inset in Figure 5.13C shows a magnification of the voltammogram, where it can be observed the increase in the current at around 0.32 V when the perspiration sample was added. Figure 5.13D exhibits the j-t curve registered at 0.32 V, where the electrode was evaluated towards the successive additions of perspiration and two concentration levels of a stock solution of UA.

The concentrations of AA and UA were calculated by using the external calibration curves presented in Figure 5.8C and Figure 5.8D and the results can be found in Table 5.7.

On average, the AA concentration in urine is higher than in perspiration. The AA levels calculated for Subjects I-III are lower than the LOD or LOQ of the method. For instance, the j-t curve registered at 0.1 V showed no differences after the addition of the perspiration sample collected from Subject I. On

the other hand, the AA concentration in perspiration samples collected from Subjects II-III is high enough to observe an increase of the signal registered on the j-t curve. However, the AA concentration is lower than the LOQ of the method, and as a consequence, the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode could not accurately determine the concentration of AA in these 2 perspiration samples.

Table 5.7. Determination of AA and UA in real perspiration samples.

Subject/ Analyte	Dil.	C _{sample} ^a (μ M)	Spiked (mM)	Found ^b (mM)	Recov. (%) ^c	
I	AA	1:1.3	< LOD	0.1	0.11 \pm 0.02	97 \pm 5
				0.2	0.18 \pm 0.02	88 \pm 5
	UA	1:2	27 \pm 13	0.1	0.125 \pm 0.014	110 \pm 13
				0.2	0.197 \pm 0.015	93 \pm 13
II	AA	1:1.3	< LOQ	0.1	0.102 \pm 0.006	102 \pm 25
				0.2	0.193 \pm 0.006	96 \pm 12
	UA	1:2	13 \pm 13	0.1	0.107 \pm 0.013	101 \pm 22
				0.2	0.208 \pm 0.013	101 \pm 11
III	AA	1:1.3	< LOQ	0.1	0.121 \pm 0.006	120 \pm 5
				0.2	0.225 \pm 0.008	112 \pm 2
	UA	1:2	< LOQ	0.1	0.106 \pm 0.013	107 \pm 8
				0.2	0.209 \pm 0.013	105 \pm 5
IV	AA	1:1.3	3 \pm 6	0.1	0.116 \pm 0.07	114 \pm 8
				0.2	0.223 \pm 0.011	110 \pm 4
	UA	1:2	< LOQ	0.1	0.10 \pm 0.02	103 \pm 4
				0.2	0.20 \pm 0.02	100 \pm 1
V	AA	1:1.3	4 \pm 10	0.1	0.090 \pm 0.007	89
				0.2	0.206 \pm 0.008	102
	UA	1:2	39 \pm 13	0.1	0.124 \pm 0.015	90 \pm 6
				0.2	0.22 \pm 0.02	94 \pm 8

^a The concentration of the analyte in the sample taking into account the dilution applied.

^{b,c} Error calculated by confidence interval.

The healthy concentrations levels of AA in perspiration have been established between 0.11 and 36 μM [72], thus almost all the AA concentrations determined in perspiration samples are included in the fixed range.

Otherwise, when the UA analysis was performed, because of the dilution of the perspiration sample, the AA concentration was lower than the LOD or LOQ achieved with hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode. As a result, the calibration curve obtained for UA by horizontal configuration was employed for determining the concentration of UA (Figure 5.8D).

On the other hand, the UA concentration in perspiration samples collected from Subjects III and IV provides a significant increase in the signal of the j-t curve recorded at 0.32 V when the sample is added but the concentration is lower than the LOQ of the method.

The trueness of the method when it is applied on perspiration samples was evaluated by adding known concentrations of AA and UA on a perspiration matrix. As it can be checked in Table 5.7, all the recoveries calculated, for both AA and UA, are included in the established range between 80 and 120%. As a result, it can be concluded that the calculated trueness is suitable for the measurement of AA and UA in perspiration samples by using an external calibration curve.

The concentrations of UA determined in perspiration samples from Subjects I-V are included in the established range of this analyte for healthy people or near to it (between 4.2 μM and 4.8 mM) [72].

The possible correlation between the concentrations of AA and UA found in urine and perspiration samples was evaluated. The results can be seen in Figure 5.14.

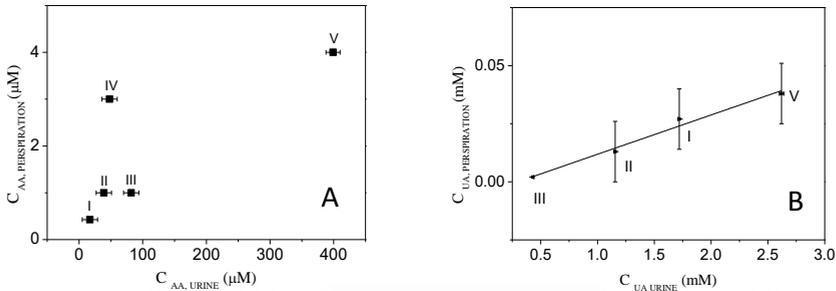


Figure 5.14. Comparison of the concentrations found in perspiration and urine samples of: A) AA. B) UA.

Figure 5.14A shows the qualitative evaluation of the possible correlation between AA concentrations found in urine and perspiration samples. Therefore, the AA concentration calculated in perspiration samples collected from Subjects II and III were included in the plot, even than these concentrations were lower than the LOQ. The AA concentration calculated in perspiration from Subject I, which was lower than 0.65 μM was also included. Even though that is not a quantitative analysis, some conclusions can be drawn. The highest concentration of AA was found in both samples collected from Subject V and the lowest concentration of AA in samples collected from Subject I. However, to be able to quantify this correlation, a deeper study should be performed. Additionally, in order to quantify the correlation between UA concentrations in both fluids, the analysis of R^2 -value of regression analysis was applied. It is important to highlight that the UA concentrations in samples collected from Subject IV are not shown in the plot because the low UA concentration calculated in perspiration sample,

which was considered as an anomalous value. Also, the UA concentration calculated from perspiration sample of Subject III was included, even though the concentration was lower than the LOQ of the method. Figure 5.14B presents the correlation plot, where the UA concentrations showed a R^2 -value of 0.975 indicating a significant correlation in the results obtained.

3.4.3. Serum samples

The hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode was evaluated towards AA and UA quantification in serum matrices. Blood samples were collected from two healthy subjects, both women in their thirties (Subject II and a new Subject VI). Two blood samples were collected in two different clear polyethylene terephthalate (PET) tubes. These tubes are suitable to analyse the serum component, filling with a gel, which allows separating the blood in two components (serum and plasma). Thirty minutes after the blood sample was collected, it was centrifuged during 10 minutes at 3000 rpm, and after that, the supernatant (serum) was ready to be used. The AA and UA in the serum samples were analysed by chronoamperometry of the diluted serum sample (1:2) at 0.1 V and 0.32 V, respectively, and by using the horizontal configuration.

Figure 5.15 shows the behaviour of the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in a serum matrix. The AA oxidation in serum samples is shown in Figure 5.15A and Figure 5.15B, while Figure 5.15C and Figure 5.15D present the results obtained for UA oxidation.

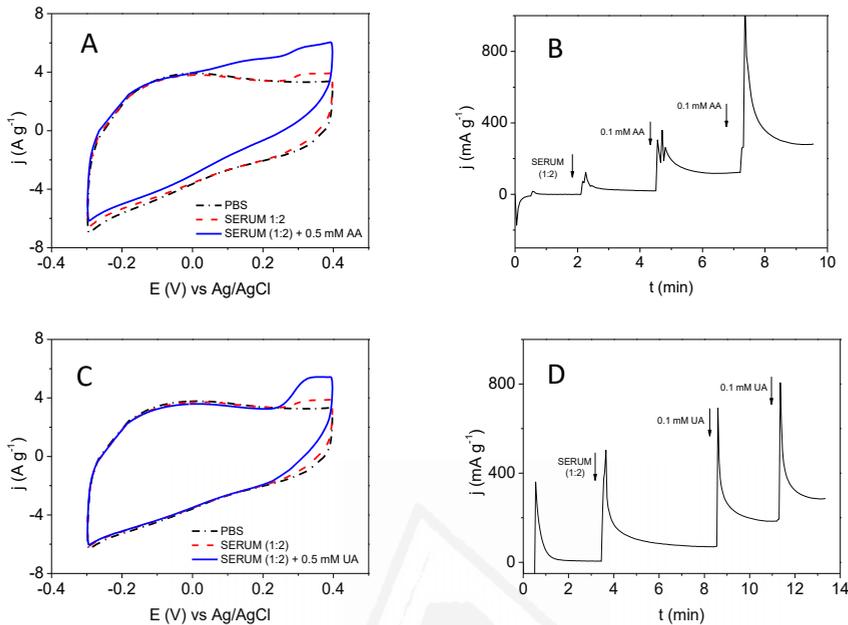


Figure 5.15. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real serum samples towards: A-B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted serum (1:2) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of AA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted serum (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted serum (1:2) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of UA added (solid line). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted serum (1:2) and 0.1 mM UA (2 times). $E_i = 0.0 \text{ V}$. All the analyses have been performed by using the drop-cell (horizontal configuration).

Figure 5.15A and Figure 5.15B exhibit the results obtained for the AA quantification. Figure 5.15A displays the voltammograms obtained in PBS and after the addition of the diluted serum and an aliquot of a stock solution of AA. As it can be observed, no differences at around 0.1 V in the voltammogram were found after the addition of the serum sample. However, the subsequent addition of 500 μM of AA showed an increase in the current, which begins at 0.001 V. Chronoamperometry at 0.1 V was performed and the registered j-t curve is presented in Figure 5.15B. As it can

be observed, the addition of the sample significantly increases the current registered.

Figure 5.15C and Figure 5.15D show the electrochemical study for the quantification of UA in serum samples. Figure 5.15C displays the voltammograms obtained in PBS and after the addition of the diluted serum (1:2) and an aliquot of a stock solution of UA. As it can be observed, the addition of the serum sample causes the appearance of an oxidation current at around 0.34 V. This behavior was also observed in Figure 5.15A and it should be related to the amount of UA in serum. Figure 5.15D exhibits the j - t curve registered at 0.32 V with the successive additions of serum (1:2) and two concentration levels of UA.

The quantification of both analytes was performed by using the external calibration curves presented in Figure 5.8C and Figure 5.10B, and the results can be found in Table 5.8.

The AA concentration levels for healthy people in serum are between 30 and 90 μM [5,58]. Thus, the sample collected from Subject II is within the established range, while AA concentration calculated in the serum from Subject VI may indicate marginal deficiency [5].

Normal levels of UA in serum have been established between 120 and 450 μM [6,73], thus as can be observed in Table 5.8, both serum samples analysed have an amount of UA included in this range.

Table 5.8. Determination of AA and UA in real serum samples.

Subject/ Analyte	Dil.	$C_{\text{sample}}^{\text{a}}$ (μM)	Spike (mM)	Found ^b (mM)	Recovery (%) ^c	
II	AA	1:2	40 ± 6	0.1	0.107 ± 0.006	89 ± 12
				0.2	0.259 ± 0.006	117 ± 14
	UA	1:5	281 ± 13	0.1	0.163 ± 0.013	105 ± 2
				0.2	0.259 ± 0.006	117 ± 14
VI	AA	1:2	18 ± 6	0.1	0.104 ± 0.006	95 ± 17
				0.2	0.193 ± 0.007	92 ± 26
	UA	1:2.25	202 ± 13	0.1	0.155 ± 0.013	84 ± 6
				0.2	0.358 ± 0.014	110 ± 22

^a The concentration of the analyte in the sample taking into account the dilution applied.

^{b,c} Error calculated by confidence interval.

All the recoveries calculated, for both AA and UA, are included in the established range between 80 and 120%. As a result, it can be concluded that the developed method is able to perform the determination of AA and UA in serum samples and by using an external calibration curve. In addition, in order to demonstrate that the performance characteristics of the method are adequate for the quantification of UA in serum matrixes, the concentration of UA in the serum sample collected from Subject VI was analysed by a certified laboratory and by using the uricase-peroxidase method and the AU5800 analyser. Results obtained show a concentration of UA of 3.51 mg dL⁻¹. If this result is compared with the one obtained by the developed method, it can be concluded that no significant differences can be observed between both results ($C_{\text{UA}} = 3.4 \pm 0.2 \text{ mg dL}^{-1}$; 96.9 % recovery). As a result of the convenient trueness and precision of the method can be

assessed that the developed method provides results with a remarkable accuracy.

3.4.4. Blood samples

The most desirable fact would be to measure the concentration of AA and UA directly from blood, it means, avoiding the coagulation and centrifugation steps, thus saving time and efforts. For that, blood samples were collected in a clear PET tube filled with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to avoid the blood coagulation. The hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode was evaluated by CV and chronoamperometry towards AA and UA quantification in blood samples. The voltammograms and the j - t curves registered are shown in Figure 5.16. Figure 5.16A and Figure 5.16B present the voltammetric and chronoamperometric behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode towards AA oxidation in blood samples. Figure 5.16A presents the voltammograms obtained in PBS solution, diluted blood (1:4) and after the addition of 500 μ M AA. As it can be seen in the Inset of Figure 5.16A, the addition of the 4-times diluted blood implies a slight increase of the current that could be ascribed to AA oxidation. Figure 5.16B shows the j - t curve obtained at 0.1 V, which is used to quantify the AA in the sample. As it can be checked, when diluted blood sample and the successive aliquots of a stock solution of AA were added, an increase in the current is observed. The same study was performed for UA oxidation but chronoamperometry was carried out at 0.32 V. The results are presented in Figure 5.16C and Figure 5.16D.

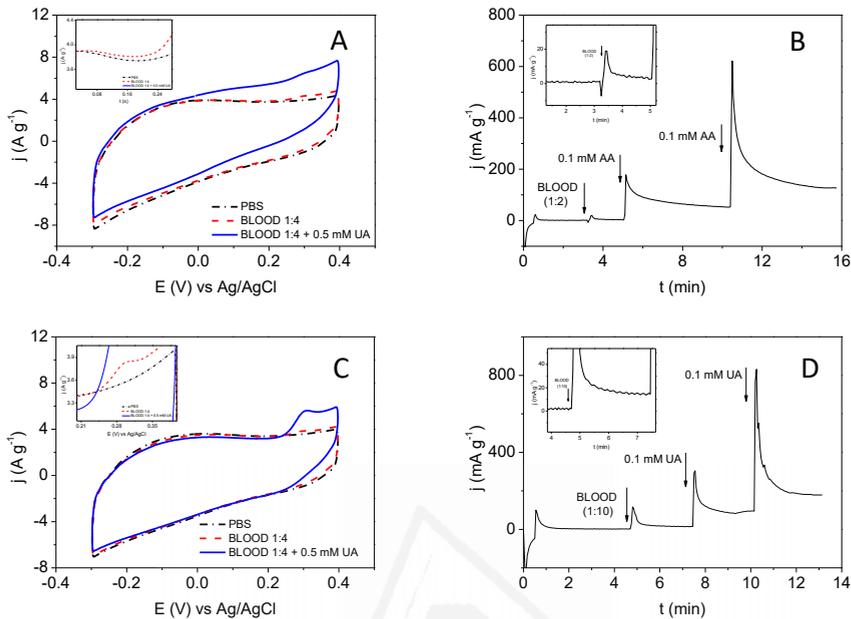


Figure 5.16. Evaluation of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode in real blood samples towards: A- B) AA quantification by: A) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted blood (1:4) (dashed line), diluted serum with 0.5 mM of AA added (solid line). Inset: magnification of the voltammogram. $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. B) j-t curve registered at 0.1 V for the addition of diluted blood (1:2) and 0.1 mM AA (2 times). Inset: j-t curve magnification. $E_i = 0.0 \text{ V}$. C-D) UA quantification by: C) CV performed in: PBS (dash-dotted line), diluted blood (1:4) (dashed line), diluted blood with 0.5 mM of UA added (solid line). Inset: magnification of the voltammogram. $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. D) j-t curve registered at 0.32 V for the addition of diluted blood (1:10) and 0.1 mM UA (2 times). Inset: j-t curve magnification. $E_i = 0.0 \text{ V}$. All the analyses have been performed by using the drop-cell (horizontal configuration).

Table 5.9 presents the results obtained for the quantification of AA in a 2-times diluted blood samples and the ones for UA quantification in samples diluted 5 and 10 times. As it can be observed in Table 5.9, it is mandatory to dilute at least 10 times to obtain recoveries between the established values for ensuring the measurement quality. Moreover, the UA concentration in the ten times diluted blood sample is lower than the LOQ of the method, thus, it is not possible to accurately determine the UA concentration in this

sample. However, this method represents a step forward for blood sample analyses.

Blood is a complex matrix sample, which uses to provide matrix effects, thus external calibration curves are barely employed. In the present work, a blood sample has been evaluated with dilutions 1:2, 1:5 and 1:10. Results allow concluding that blood samples should be diluted at least 10 times in order to avoid matrix effects. Outstanding results have been achieved, because no other method able to avoid the blood matrix effects just by the dilution of the sample has been found.

Table 5.9. Evaluation of the trueness for the AA and UA quantification in blood samples for several dilutions.

Analyte/ Subject	Dil.	C _{sample} (μM) ^a	Spiked (mM)	Found ^b (mM)	Recovery (%)
AA, VI	1:2	< LOQ	0.1	0.053 \pm 0.006	51
			0.2	0.128 \pm 0.006	63
UA, II	1:5	90 \pm 13	0.1	-	-
			0.2	0.13 \pm 0.02	66
UA, II	1:10	< LOQ	0.1	0.08 \pm 0.02	78
			0.2	0.358 \pm 0.014	80

^a The concentration of the analyte in the sample taking into account the dilution applied.

^b Error calculated by confidence interval.

Table 5.5 summarizes some of the developed methods for the quantification of AA, UA or both of them. To the best of our knowledge, this is the first reported work which is able to determine AA and UA on four different human fluids (urine, perspiration, serum and blood) without matrix effects

after dilution, allowing the determination of the levels of AA and UA by using the external calibration method.

4. Conclusions

A new portable sensor based on 4-aminobenzoic acid functionalized herringbone carbon nanotubes using an array of gold interdigitated microelectrodes (hCNTs-4ABA/Au-IDA) has been developed for the quantification of AA and UA in physiological fluids. In order to simulate physiological human fluids all investigations have been carried out in PBS (0.25 M, pH 7.0). First of all, the voltammetric behavior of the hCNTs-4ABA/Au-IDA modified electrode was evaluated towards the oxidation of the individual AA and UA. The voltammograms obtained showed an anodic current related to AA oxidation at 0.085 V and other anodic signal belonging to UA oxidation at 0.32 V. In order to evaluate the AA interference in the voltammetric signal of UA, or vice-versa, the voltammetric behavior of hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode was evaluated towards a mixture of AA and UA. The results obtained showed that AA does not interfere with the voltammetric measurement of UA, although when large amounts of UA are in the mixture ($C_{UA} = 600 \mu\text{M}$) the hCNTs-4ABA/Au-IDA electrode loss some capability for quantifying the AA with the consequent sensitivity decrease. Secondly, in order to quantify the AA and UA, chronoamperometry at 0.1 V and 0.32 V was performed by using two different configurations: horizontal (drop-cell) or vertical (beaker-cell) configurations. Excellent results were obtained for the separate quantification of AA and UA, with LODs and LOQs of 0.65 μM and 2.1 μM , respectively. Outstanding sensitivities and linear

ranges were obtained for both analytes. The repeatability was studied at 50 μM level for AA and UA, providing RSD values lower than 9%. The simultaneous quantification of AA and UA has been investigated by chronoamperometry. No interference of UA in the AA measurements has been observed, although if AA is in the mixture may vary the UA concentration results. In order to be able to quantify both analytes in real samples, an easy and fast strategy has been proposed. The method mainly consists in the preparation of the calibration curve for UA at 0.32 V, but being present the amount of AA that is in the real sample. No interferences of glucose, DP and EP were observed, confirming the high specificity of the sensor for AA and UA. The method has been successfully applied to filtered and diluted urine and perspiration samples and diluted serum and blood samples. The AA and UA concentrations were calculated by using an external calibration curve for each analyte, allowing to avoid the matrix effects and saving time in the analysis of each sample. The inter-sensor reproducibility was evaluated by measuring UA in a urine sample with 4 different sensors, providing a RSD of 7% and trueness was evaluated in all samples, being the recoveries between the established ranges.

These data indicate that the present portable sensor is competitive, becoming a powerful alternative for the quantification of AA and UA levels in several human fluids, like urine, perspiration, serum and blood samples.

5. References

- [1] R.J. Johnson, D.-H. Kang, D. Feig, S. Kivlighn, J. Kanellis, S. Watanabe, K.R. Tuttle, B. Rodriguez-Iturbe, J. Herrera-Acosta, M. Mazzali, Is there

- a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?, *Hypertension*, 41 (2003) 1183–1190.
- [2] I. Hisatome, M. Tsuboi, C. Shigemasa, Renal hypouricemia, *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.*, 54 (1996) 3337–3342.
- [3] I.B. Chatterjee, Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid, *Science*, 182 (1973) 1271–1272.
- [4] S. Chambial, S. Dwivedi, K.K. Shukla, P.J. John, P. Sharma, Vitamin C in disease prevention and cure: an overview, *Indian J. Clin. Biochem.*, 28 (2013) 314–328.,
- [5] A. Aditi, D.Y. Graham, Vitamin C, gastritis, and gastric disease: a historical review and update, *Dig. Dis. Sci.*, 57 (2012).
- [6] D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, P.S. Sharma, B.B. Prasad, Electrochemical Detection of Uric Acid in Mixed and Clinical Samples: A Review, *Electroanalysis*. 23 (2011) 305–320.
- [7] S.A. Wring, J.P. Hart, Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds. A review, *Analyst*, 117 (1992) 1215–1229.
- [8] R.L. McCreery, Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2646–2687.
- [9] I. Heller, J. Kong, K.A. Williams, C. Dekker, S.G. Lemay, Electrochemistry at Single-Walled Carbon Nanotubes: The Role of Band Structure and Quantum Capacitance, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 7353–7359.
- [10] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Role of Carbon Nanotubes in Analytical Science, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 4788–4797.
- [11] I. Heller, J. Kong, H.A. Heering, K.A. Williams, S.G. Lemay, C. Dekker, Individual Single-Walled Carbon Nanotubes as Nanoelectrodes for Electrochemistry, *Nano Lett.*, 5 (2005) 137–142.
- [12] Wildgoose, Gregory G., Banks, Craig E., Leventis, Henry C., Compton, Richard G., Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis, (2006) 152, 187–214.
- [13] C.E. Banks, T.J. Davies, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites, *Chem. Commun.*, (2005) 829–841.
- [14] K. Gong, Y. Yan, M. Zhang, L. Su, S. Xiong, L. Mao, Electrochemistry and Electroanalytical Applications of Carbon Nanotubes: A Review, *Anal. Sci.*, 21 (2005) 1383–1393.

- [15] E. Unger, A. Graham, F. Kreupl, M. Liebau, W. Hoenlein, Electrochemical functionalization of multi-walled carbon nanotubes for solvation and purification, *Curr. Appl. Phys.* 2 (2002) 107–111.
- [16] X. Chu, K. Kinoshita, Surface modification of carbons for enhanced electrochemical activity, *Mater. Sci. Eng. B.*, 49 (1997) 53–60.
- [17] V.V. Strelko, V.S. Kuts, P.A. Thrower, On the mechanism of possible influence of heteroatoms of nitrogen, boron and phosphorus in a carbon matrix on the catalytic activity of carbons in electron transfer reactions, *Carbon*, 38 (2000) 1499–1503.
- [18] D. Wei, C. Kvarnström, T. Lindfors, A. Ivaska, Electrochemical functionalization of single walled carbon nanotubes with polyaniline in ionic liquids, *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 206–210.
- [19] D.H. Lee, W.J. Lee, S.O. Kim, Highly Efficient Vertical Growth of Wall-Number-Selected, N-Doped Carbon Nanotube Arrays, *Nano Lett.* 9 (2009) 1427–1432.
- [20] C. González-Gaitán, R. Ruiz-Rosas, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Functionalization of carbon nanotubes using aminobenzene acids and electrochemical methods. Electroactivity for the oxygen reduction reaction, *Int. J. Hydrog. Energy*, 40 (2015) 11242–11253.
- [21] G.G. Wildgoose, S.J. Wilkins, G.R. Williams, R.R. France, D.L. Carnahan, L. Jiang, T.G.J. Jones, R.G. Compton, Graphite Powder and Multiwalled Carbon Nanotubes Chemically Modified with 4-Nitrobenzylamine, *ChemPhysChem.*, 6 (2005) 352–362.
- [22] D.P. Kim, C.L. Lin, T. Mihalisin, P. Heiney, M.M. Labes, Electronic properties of nitrogen-doped graphite flakes, *Chem. Mater.*, 3 (1991) 686–692.
- [23] S. Maldonado, S. Morin, K.J. Stevenson, Structure, composition, and chemical reactivity of carbon nanotubes by selective nitrogen doping, *Carbon*. 44 (2006) 1429–1437. doi:10.1016/j.carbon.2005.11.027.
- [24] H. Zhang, J. Zhang, J. Zheng, Electrochemical behavior of modified electrodes with carbon nanotubes and nanofibers: application to the sensitive measurement of uric acid in the presence of ascorbic acid, *Measurement.*, 59 (2015) 177–183.
- [25] J. de Fátima Giarola, A. César Pereira, Development and application of a sensor based on carbonaceous materials and cobalt phthalocyanine composite for electrochemical determination of uric acid, *Electroanalysis*, 28 (2016) 1348–1355. doi:10.1002/elan.201501032.

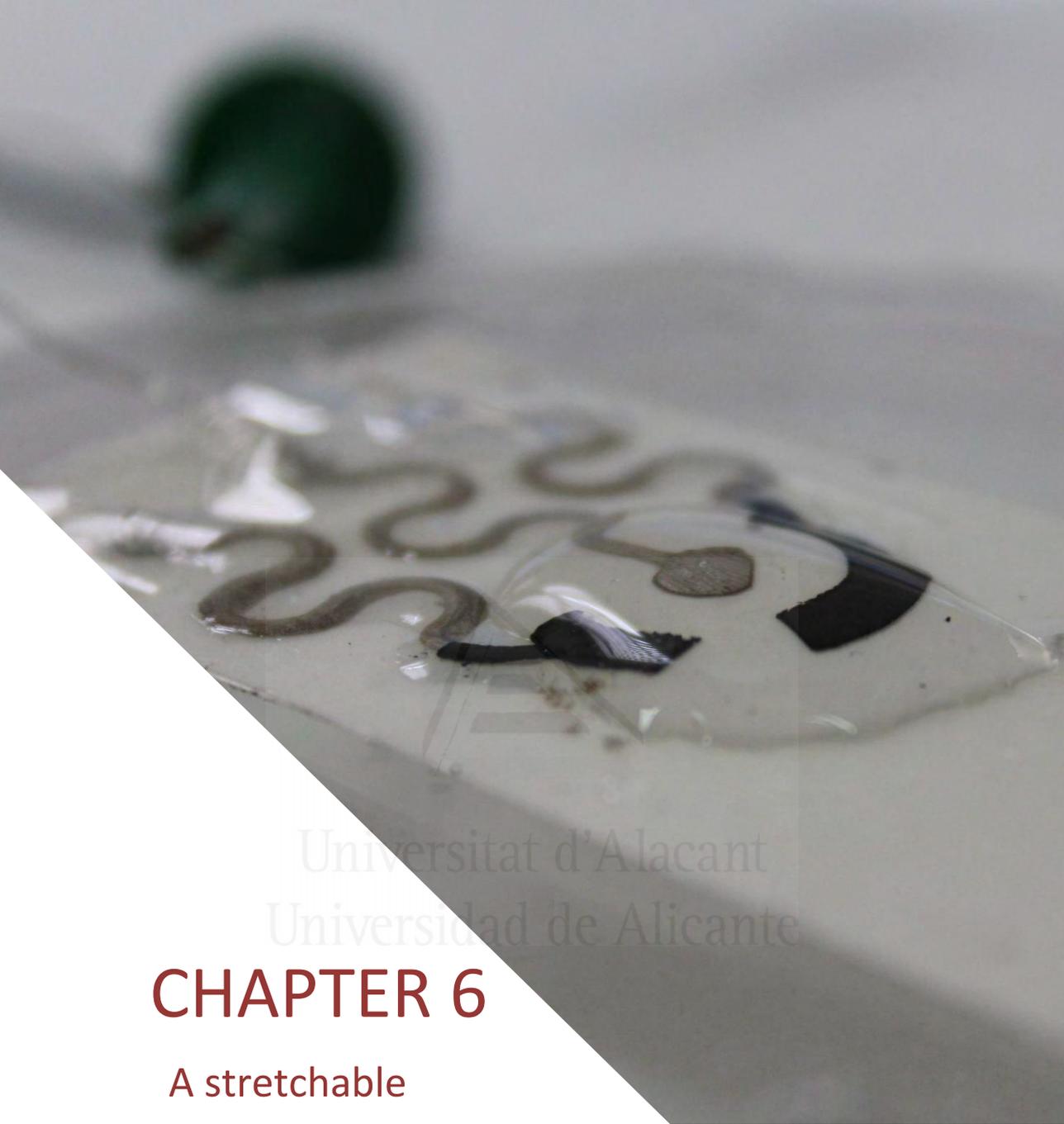
- [26] K. Deng, X. Li, H. Huang, A glassy carbon electrode modified with a nickel(II) norcorrole complex and carbon nanotubes for simultaneous or individual determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid, *Microchim. Acta*, 183 (2016) 2139–2145.
- [27] L.V. da Silva, F. a. S. Silva, L.T. Kubota, C.B. Lopes, P.R. Lima, E.O. Costa, W.P. Júnior, M.O.F. Goulart, Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanillic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid, *J. Solid State Electrochem.*, 20 (2016) 2389–2393.
- [28] S. Yan, X. Li, Y. Xiong, M. Wang, L. Yang, X. Liu, X. Li, L.A.M. Alshahrani, P. Liu, C. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a glassy carbon electrode modified with the nickel(II)-bis(1,10-phenanthroline) complex and single-walled carbon nanotubes, *Microchim. Acta*, 183 (2016) 1401–1408.
- [29] A.K. Bhakta, R.J. Mascarenhas, O.J. D'Souza, A.K. Satpati, S. Detriche, Z. Mekhalif, J. Dalhalle, Iron nanoparticles decorated multi-wall carbon nanotubes modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for the simultaneous determination of uric acid in the presence of ascorbic acid, dopamine and l-tyrosine, *Mater. Sci. Eng. C*, 57 (2015) 328–337.
- [30] A.K. Das, C.R. Raj, Electrochemical decoration of carbon nanotubes with Au nanostructure for the electroanalysis of biomolecules, *Anal. Sci.*, 31 (2015) 711–714.
- [31] N.G. Tsierkezos, U. Ritter, Y.N. Thaha, C. Downing, P. Szroeder, P. Scharff, Multi-walled carbon nanotubes doped with boron as an electrode material for electrochemical studies on dopamine, uric acid, and ascorbic acid, *Microchim. Acta*, 183 (2015) 35–47.
- [32] N.G. Tsierkezos, S.H. Othman, U. Ritter, L. Hafermann, A. Knauer, J.M. Köhler, C. Downing, E.K. McCarthy, Electrochemical analysis of ascorbic acid, dopamine, and uric acid on nobel metal modified nitrogen-doped carbon nanotubes, *Sens. Actuators B Chem.*, 231 (2016) 218–229.
- [33] D.M. Fernandes, M. Costa, C. Pereira, B. Bachiller-Baeza, I. Rodríguez-Ramos, A. Guerrero-Ruiz, C. Freire, Novel electrochemical sensor based on N-doped carbon nanotubes and Fe₃O₄ nanoparticles: Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid, *J. Colloid Interface Sci.*, 432 (2014) 207–213.

- [34] Y.-T. Shieh, H.-F. Jiang, Graphene oxide-assisted dispersion of carbon nanotubes in sulfonated chitosan-modified electrode for selective detections of dopamine, uric acid, and ascorbic acid, *J. Electroanal. Chem.*, 736 (2015) 132–138.
- [35] S. He, Y. Yu, Z. Chen, Q. Shi, L. Zhang, Synergistic effect of graphene and multiwalled carbon nanotubes on a glassy carbon electrode for simultaneous determination of uric acid and dopamine in the presence of ascorbic acid, *Anal. Lett.*, 48 (2015) 248–258.
- [36] S. Cinti, F. Arduini, M. Carbone, L. Sansone, I. Cacciotti, D. Moscone, G. Palleschi, Screen-printed electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene, *Electroanalysis*, 27 (2015) 2230–2238.
- [37] E. Mehmeti, A. Hajrizi, T. Arbneshi, K. Žagar, A. Samphao, K. Kalcher, Determination of ascorbic acid based on heterogeneous carbon sensors modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 7 (2016) 140–151.
- [38] Y.F. Sha, M. Zhao, F. Guo, M. Zhao, M.Q. Yang, A simple and rapid electrochemical method for determination of ascorbic acid, *Appl. Mech. Mater.*, 341–342 (2013) 866–869.
- [39] P. Fanjul-Bolado, D.H. Santos, V.M. Montoya, A. Costa-García, Uric acid determination by adsorptive stripping voltammetry on multiwall carbon nanotubes based screen-printed electrodes, *Electroanalysis*, 27 (2015) 1276–1281.
- [40] S.-H. Huang, H.-H. Liao, D.-H. Chen, Simultaneous determination of norepinephrine, uric acid, and ascorbic acid at a screen printed carbon electrode modified with polyacrylic acid-coated multi-wall carbon nanotubes, *Biosens. Bioelectron.*, 25 (2010) 2351–2355.
- [41] R. Lanche, L.E. Delle, M. Weil, X.T. Vu, V. Pachauri, W.M. Munief, P. Wagner, S. Ingebrandt, Routine fabrication of reduced graphene oxide microarray devices via all solution processing, *Phys. Status Solidi A*, 210 (2013) 968–974.
- [42] A. Abellán-Llobregat, M. Ayán-Varela, L. Vidal, J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Canals, E. Morallón, Flavin mononucleotide-exfoliated graphene flakes as electrodes for the electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid, *J. Electroanal. Chem.*, *J. Electroanal. Chem.*, 783 (2016) 41–48.
- [43] A. Abellán-Llobregat, L. Vidal, R. Rodríguez-Amaro, Á. Berenguer-Murcia, A. Canals, E. Morallón, Au-IDA microelectrodes modified with

- Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples, *Electrochimica Acta*, 227 (2017) 275–284.
- [44] J. Du, J.J. Cullen, G.R. Buettner, Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.*, 1826 (2012) 443–457.
- [45] Z. Wang, E. Königsberger, Solubility equilibria in the uric acid–sodium urate–water system, *Thermochim. Acta*, 310 (1998) 237–242.
- [46] A. González, E. Goikolea, J.A. Barrena, R. Mysyk, Review on supercapacitors: Technologies and materials, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 58 (2016) 1189–1206.
- [47] E. Raymundo-Piñero, D. Cazorla-Amorós, A. Linares-Solano, J. Find, U. Wild, R. Schlögl, Structural characterization of N-containing activated carbon fibers prepared from a low softening point petroleum pitch and a melamine resin, *Carbon*, 40 (2002) 597–608.
- [48] G. Yang, Y. Shen, M. Wang, H. Chen, B. Liu, S. Dong, Copper hexacyanoferrate multilayer films on glassy carbon electrode modified with 4-aminobenzoic acid in aqueous solution, *Talanta*, 68 (2006) 741–747.
- [49] A. Benyoucef, F. Huerta, J.L. Vázquez, E. Morallon, Synthesis and in situ FTIRS characterization of conducting polymers obtained from aminobenzoic acid isomers at platinum electrodes, *Eur. Polym. J.*, 41 (2005) 843–852.
- [50] M.C. Román-Martínez, D. Cazorla-Amorós, A. Linares-Solano, C.S.-M. de Lecea, Tpd and TPR characterization of carbonaceous supports and Pt/C catalysts, *Carbon*, 31 (1993) 895–902.
- [51] C. González-Gaitán, R. Ruiz-Rosas, H. Nishihara, T. Kyotani, E. Morallón, D. Cazorla-Amorós, Successful functionalization of superporous zeolite templated carbon using aminobenzene acids and electrochemical methods, *Carbon*, 99 (2016) 157–166.
- [52] H. Xu, J. Xiao, L. Yan, L. Zhu, B. Liu, An electrochemical sensor for selective detection of dopamine based on nickel tetrasulfonated phthalocyanine functionalized nitrogen-doped graphene nanocomposites, *J. Electroanal. Chem.*, 779 (2016) 92–98.
- [53] 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.*, 34 (2012) 125–131.

- [54] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B.*, 107 (2003) 3712–3718.
- [55] K. Balasubramanian, M. Burghard, Chemically functionalized carbon nanotubes, *Small*, 1 (2005) 180–192.
- [56] Miller, J., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson, 6th edition, 2010.
- [57] M. Mazzali, J. Hughes, Y.-G. Kim, J.A. Jefferson, D.-H. Kang, K.L. Gordon, H.Y. Lan, S. Kivlighn, R.J. Johnson, Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism, *Hypertension*, 38 (2001) 1101–1106.
- [58] A.A. Fowler, A.A. Syed, S. Knowlson, R. Sculthorpe, D. Farthing, C. DeWilde, C.A. Farthing, T.L. Larus, E. Martin, D.F. Brophy, S. Gupta, Medical Respiratory Intensive Care Unit Nursing, B.J. Fisher, R. Natarajan, Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis, *J. Transl. Med.*, 12 (2014) 32.
- [59] J. Wang, Electrochemical glucose biosensors, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 814–825.
- [60] C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton, Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Anal. Chim. Acta*, 662 (2010) 105–127.,
- [61] K. Hashizume, A. Yamatodani, T. Ogihara, Free and total dopamine in human plasma: effects of posture, age and some pathophysiological conditions, *Hypertens. Res.*, 18 (1995) S205–S207.
- [62] H. Devnani, S.P. Satsangee, R. Jain, A novel graphene-chitosan-Bi₂O₃ nanocomposite modified sensor for sensitive and selective electrochemical determination of a monoamine neurotransmitter epinephrine, *Ionics*, (2015) 1–14.
- [63] D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, I.J. Kopin, Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305 (2003) 800–811.
- [64] S. Ramakrishnan, K.R. Pradeep, A. Raghul, R. Senthilkumar, M. Rangarajan, N.K. Kothurkar, One-step synthesis of Pt-decorated graphene-carbon nanotubes for the electrochemical sensing of dopamine, uric acid and ascorbic acid, *Anal. Methods*, 7 (2015) 779–786.
- [65] H. Hu, Y. Song, M. Feng, H. Zhan, Carbon nanomaterials for simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence

- of ascorbic acid: from one-dimensional to the quasi one-dimensional, *Electrochimica Acta*, 190 (2016) 40–48.
- [66] L. Yang, D. Liu, J. Huang, T. You, Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, *Sens. Actuators B Chem.*, 193 (2014) 166–172.
- [67] F.T. Thorpe, Ascorbic acid in urine, *Br. Med. J.*, 1 (1938) 542.
- [68] German Nutrition Society (DGE), New reference values for vitamin C intake, *Ann. Nutr. Metab.*, 67 (2015) 13–20.
- [69] O. Trexer, B. Huet, J. Poindexter, C.Y.C. Pak, M.S. Pearke, Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors, *J. Urol.*, 170 (2003) 397–401.
- [70] Kissinger, P.T., Pachla, L.A., Reynolds, LD., Wright, S., Analytical methods for measuring uric acid in biological samples and food products, 1987 *J Assoc Anal Chem.*, 70 P1.
- [71] Damm, H.C., *Handbook of clinical laboratory data*, The Chemical Rubber Company, Cleveland, 1965.
- [72] C.J. Harvey, R.F. LeBouf, A.B. Stefaniak, Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use, *Toxicol. In Vitro*, 24 (2010) 1790–1796.
- [73] M.K. Kutzing, B.L. Firestein, Altered uric acid levels and disease states, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 324 (2008) 1–7.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CHAPTER 6

A stretchable
and screen-printed
electrochemical sensor for
glucose determination in human perspiration

1. Introduction

Diabetes is a chronic disease with overwhelming human, social and economic consequences. It is caused by insufficient insulin production or secretion, which impedes the ability of cells to digest glucose from the blood. Seven million people develop diabetes annually and the World Health Organization (WHO) has forecast a 50% increase in the number of diabetes-related deaths over the next decade [1]. Although there is no way to cure or prevent diabetes, appropriate monitoring and quantification of glucose levels can improve treatment efficiency and simplify patient lifestyle. As a result, there is substantial interest in electrochemical sensors for glucose detection and quantification. Most of these electrochemical sensors are enzyme-based, and depend on invasive blood sampling techniques [2–4]. Even modern glucose meters, like the popular Accu-Check®, rely on the measurement on blood samples [5]. The painful finger-stick is the main drawback leading to patient non-compliance and also makes it impossible to achieve real-time information required for some biomedical applications. Therefore, major scientific effort is being made to develop non-invasive glucose monitoring diagnostic tools [6–8]. For instance, human perspiration offers valuable information about health status depending on the levels of several analytes, like lactate, ammonium, and glucose [9,10]. Interestingly, glucose monitoring provides a correlation between glucose levels in blood and perspiration for diabetic patients, with concentration ranging between 10 μM and 0.7 mM, the common perspiration glucose concentrations of hypoglycaemic and hyperglycaemic

patients as well as healthy people [11–13].

Development of soft, stretchable and body-integrated glucose sensors has the potential to address the lack of devices for real-time monitoring of glucose levels. Taking into account that the human epidermis is continuously subjected to bending and stretching movements during common physical activity, skin-worn stick-on sensors must have high resilience. As a result, Wang and co-workers focused on the development of wearable electrochemical devices able to monitor several target analytes in physiological fluids, like saliva, tears or perspiration [14–17].

First we present the development of a highly stretchable Pt-decorated graphite based non-enzymatic glucose sensor. To our knowledge this is the first example of a stick-on Pt-NPs based stretchable non-enzymatic electrochemical sensor. The highly stretchable nature and enzyme-free glucose detection offered by the Pt-NPs ink developed in this study provides an attractive alternative to the present blood glucometers for developing body-worn sensors for real-time, non-invasive diabetes management. In the present study, Pt-decorated graphite was used as the ink filler. Pt-NPs have high electro-activity, even with low amounts of the Pt metal on the electrode, thus keeping the cost of the device low [18,19].

Although the enzyme-free electrochemical determination of glucose concentration is the most desirable, the selectivity and sensitivity can be greatly enhanced by the immobilization of GOx. This enzyme contains the flavin adenine dinucleotide cofactor (FAD), the active center where glucose oxidation takes place [20]. First-generation biosensors are based on the use of oxygen as electron acceptor and the ensuing generation and

quantification of H_2O_2 [21,22]. The presence of Pt within the stretchable electrodes permits the detection of H_2O_2 at less positive potentials and thus minimizes interference by electro-active species, such as, AA or UA, which are electro-active at more positive potentials [23]. Despite these benefits, most of the first-generation biosensors were developed to detect H_2O_2 oxidation and few studies can be found on the electrochemical detection of glucose based on H_2O_2 reduction [24,25]. This represents the first example of a stretchable electrochemical sensor able to detect glucose in perspiration samples by measuring reduction of H_2O_2 with the lowest cathodic potential. The sensors are based on graphite decorated with Pt and GOx (GOx/Pt-graphite biosensor) (Figure 6.1A). This sensor is useful for real-time, non-invasive enzymatic detection and quantification of glucose by H_2O_2 reduction in perspiration. The skin-worn sensor reported here has been successfully applied to real human perspiration samples, proving an attractive route for the non-invasive detection of glucose.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and apparatus

Graphite black powder was purchased from ACROS Organics™ (A Thermo Fisher Scientific), isophorone was obtained from Alfa Aesar, flexible stretchable fabric glue polymer (binder) from Aleene's, Ag/AgCl ink (E2414) from Ercon Inc. Silver epoxy adhesive was bought from Electron Microscopy Sciences.

Hexachloroplatinic acid (H_2PtCl_6), sodium borohydride (NaBH_4), Ecoflex® 00-30 (Smooth-On, Inc., PA), temporary transfer tattoo paper (HPS Papilio,

Rhyme, TX), polyurethane (PU) (Tecoflex SG-80A), potassium ferricyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$), chitosan from crab shells, glucose oxidase from *Aspergillus niger*, bovine serum albumin (BSA), Nafion[®] 117 solution 5%, glucose, uric acid ($\geq 99\%$, crystalline), L-ascorbic acid (reagent grade, crystalline), dopamine hydrochloride, and epinephrine standard chemicals, were provided by Sigma-Aldrich. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) obtained by Emsure[®] and Sigma-Aldrich respectively, were used to prepare buffer solutions. Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Merck. Glacial acetic acid for analysis was obtained from Panreac. Ultrapure water was obtained by a treatment in Purelab Ultra Elga with a resistivity of 18 M Ω cm. A Contour XT[®] glucose meter and strips Contour[®]Next were purchased from Bayer.

Ecoflex[®] 00-30 was prepared by mixing equal volumes of pre-polymer A with pre-polymer B provided by the supplier. Similarly, conductive silver epoxy adhesive was prepared by mixing equal volumes of two parts provided by the supplier.

Transmission electron microscopy measurements (TEM) were carried out using a JEOL TEM, JEM-2010 model, which is equipped with an Oxford X-ray detector (EDX), INCA Energy TEM 100 model, and GATAN acquisition camera. Scanning electron micrographs were taken using an ORIUS SC600 model Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) using a ZEISS microscope, Merlin VP Compact model, with an EDX Bruker, Quantax 400 model.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed using a VG-Microtech Multilab 3000 spectrometer using non-monochromatized MgK α

(1253.6 eV) radiation from a twin anode source operated at 300 W (20 mA, 15 kV). Photoelectrons were collected in a hemispherical analyser working in the constant energy mode at the pass energy of 50 eV. The binding energy (BE) of the C1s peak at 286.4 eV was taken as internal standard.

2.2. Preparation of the sensors

2.2.1. Pt-decorated graphite synthesis and purification

Pt-NPs were synthesized on the graphite support by following a reduction method at room temperature and atmospheric pressure. In order to achieve 4 wt% of Pt-NPs on graphite support, the following procedures were applied:

Solution I, 0.6 g of graphite was added to 2 mL of distilled water in a glass container. The solution was maintained under stirring conditions for 12 hours to achieve homogeneous dispersion. After that, 4 mL of hexachloroplatinic acid (30 mM H_2PtCl_6) was added to solution I and stirred for an hour.

Solution II ($85 \text{ mg mL}^{-1} \text{ NaBH}_4$) was slowly added to solution I and stirred for 2 hours in order to reduce most of the Pt precursor.

The prepared nanoparticles deposited on graphite were purified by vacuum filtration, washed with an excess of ethanol and, finally, the solid obtained was dried in an oven at 60°C for 30 min.

2.2.2. Preparation of the inks

Three different inks were used for the further printing of the WE, CE and pseudo-reference electrode.

For WE preparation, a 75 wt% Pt-graphite/25 wt% binder ink was prepared as follows: 100 mg of Pt-graphite powder was well mixed with 30 mg of stretchable binder to ensure a good homogeneity. Next, 200 μL of isophorone was added to the mixture in 50 μL aliquots and manually mixed (Figure 6.1B). Employing the same method, an ink comprising 75 wt% graphite/ 25 wt% binder was prepared for further printing of the CE.

Finally, a commercial silver/silver chloride (Ag/AgCl) ink was used as RE, with 10 wt% of Ecoflex[®] to ensure stretchability of the final device. The inks were electrochemically characterized by CV (Figure A-6.1) and various physicochemical techniques (Figure A-6.2).

2.2.3. Preparation of the sensors

As illustrated in Figure 6.1C, sensor preparation involves the screen printing of inks on a polyurethane (PU) sheet, previously modified as shown below. Sensor patterns were designed in AutoCAD and outsourced for manufacture on stainless steel through-hole 12" x 12" framed stencils of 125 μm thickness. Initially, a screen printing of a thick layer of Ecoflex[®] was done on a temporary transfer tattoo paper and allowed to half-cure for two hours at room temperature. After that, Ecoflex[®] was carefully placed on a PU sheet, where Ecoflex[®] curing was completed, ensuring proper contact between the two polymers. Special attention was paid to this step to avoid the appearance of air bubbles or wrinkles during attachment of the Ecoflex[®] layer onto the PU sheet. After that, a temporary transfer tattoo paper was used to cover the Ecoflex[®] layer and subsequently, the protective paper on top of the PU sheet was removed to exhibit the PU layer. Two types of

devices were printed. The simple one consists of a printed line of Pt-graphite ink, or graphite ink, which acts as WE (Pt-graphite line electrode and graphite line electrode), with Ag/AgCl and a wire of Pt being external reference and counter electrodes, respectively. This kind of device was employed to optimize all parameters of the proposed method (see Annex to chapter 6). The second device was made by successive manual printing of stretchable Ag/AgCl (pseudo-reference electrode and serpentine interconnects), stretchable graphite (CE) and Pt-decorated graphite (Pt-graphite, WE) inks to produce the whole electrochemical sensor (stretchable Pt-graphite sensor, Figure 6.1C). The printed stretchable Ag/AgCl was cured at 90°C for 4 min, and stretchable graphite and Pt-decorated graphite were cured at 50°C for 30 min, all in a convection oven. Finally, an Ecoflex® layer was printed to define the electrode area and contact pads were bound to the serpentine interconnects by using silver epoxy ink as a conductive adhesive. The final device was cured at 65°C for 10 min and kept at room temperature until use.

2.2.4. Preparation of amperometric glucose biosensors

Glucose biosensors (GOx/Pt-graphite line electrode and GOx/Pt-graphite biosensor) were manufactured by functionalizing the Pt-graphite with GOx enzyme (Figure 6.1A). To improve the GOx immobilization on the Pt-graphite electrode, the surface of the WE was covered with 1.5 μL of chitosan solution (0.5 wt%, 0.1 M acetic acid) and allowed to dry at room temperature. Next, 4.3 μL of a solution of GOx in PBS (34 mg mL^{-1}) containing bovine serum albumina (BSA (15 mg mL^{-1})) as enzyme stabilizer,

was added to the same area. When the electrode surface was completely dry, 6 μL of 5% Nafion[®] was added. The modified sensor was kept at 4°C until use.

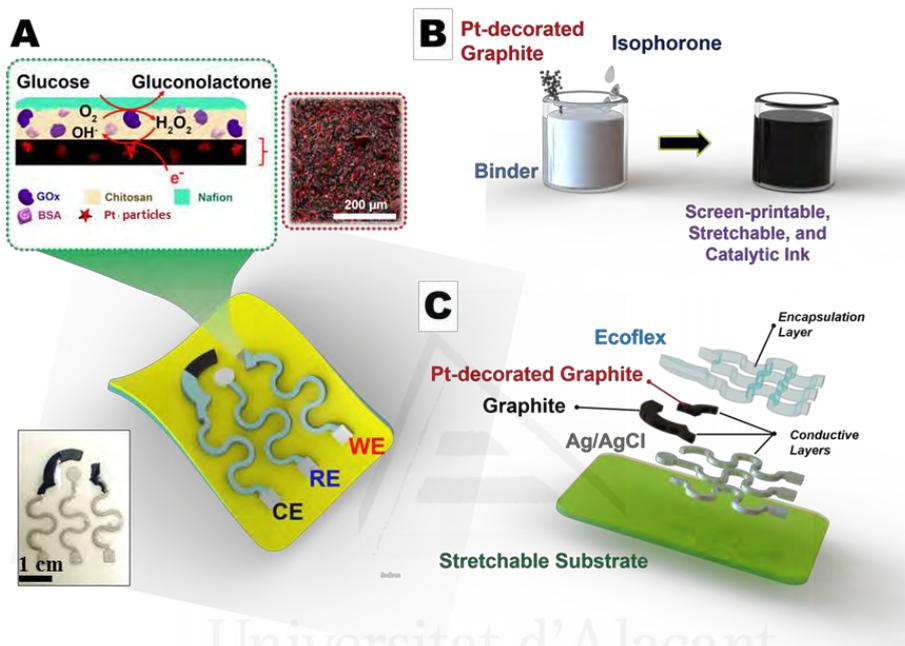


Figure 6.1. A) Diagram illustrating the design of the stretchable sensor, the enzymatic immobilization on the printed catalytic layer, and the reaction during detection. The Inset shows a real image of a screen-printed sensor. B) Preparation of the screen-printable, stretchable and catalytic ink. C) Screen-printing process showing layers of the components.

2.3. Electrochemical methods

All electrochemical measurements were carried out on a BIOLOGIC SP-300 potentiostat. All potentials presented are referred to the Ag/AgCl electrode. A three-electrode configuration was used, with three different designs. Firstly, a GC electrode modified with Pt-graphite powder was used as WE in order to characterize the synthesized material, an external Ag/AgCl as RE and a Pt wire as CE. This was the only experiment performed in a nitrogen

atmosphere. The second design consisted of a printed line of graphite, Pt-graphite or GOx/Pt-graphite as WE, an external Ag/AgCl as RE and a Pt wire as CE. The last design employed was the stretchable electrochemical biosensor (GOx/Pt-graphite biosensor) comprised of a GOx/Pt-graphite WE, a graphite CE and a stretchable printed Ag/AgCl pseudo-reference electrode. All measurements were taken in an air atmosphere, unless otherwise stated.

CV was used to characterize the material synthesized and to determine the reduction potential for H₂O₂. Quantification of H₂O₂ and glucose were carried out by chronoamperometry. The glucose sensor was calibrated in the glucose concentration range between 0 and 0.9 mM, levels corresponding to the typical perspiration glucose concentration [11,12]. All measurements were carried out in PBS (0.25 M, pH 7.0) and in triplicate (n = 3).

For real samples determination, filtered human perspiration was used and no other treatment was carried out.

3. Results and discussion

3.1. Pt-decorated graphite line sensors. Glucose oxidation

Electrochemical non-enzymatic glucose detection was performed with a Pt-graphite printed line electrode. Figure 6.2A shows the voltammograms obtained for the Pt-graphite line electrode in PBS (dashed line) and 80 mM glucose solution (solid line) in which the reduction peaks at 0 V and -0.8 V related to the reduction of platinum oxide and hydrogen evolution reaction (HER), respectively, are clearly visible in the reverse scan. In the presence of

glucose, two anodic peaks appear in the cyclic voltammogram. The first one, at -0.4 V, corresponding to the “hydrogen region”, is related to glucose oxidation at a potential where adsorbed hydrogen exits on the Pt surface. It should be noted that glucose produces the unique behavior of electrochemical oxidation in the hydrogen region when Pt is used as a WE [26]. The second one corresponds to the oxidation peak that appears in the “double layer region”, at around 0.1 V [26]. These results agree with the literature since it is proposed that glucose oxidation on Pt in neutral PBS involves the dehydrogenation at C1 carbon, showing two anodic signals [26].

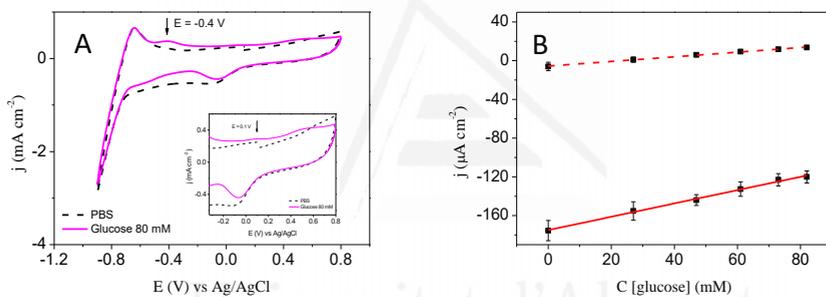


Figure 6.2. A) Cyclic voltammograms for Pt-graphite line electrode in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in 80 mM glucose (solid line). Inset: magnified zone. B) Calibration curves obtained from chronoamperometry representing the linear range at -0.4 V (solid line) and at 0.2 V (dashed line).

Chronoamperometry was performed with the Pt-graphite line electrode for glucose concentrations between 0 and 82 mM at 0.2 V and -0.4 V. The corresponding calibration curves obtained are shown in Figure 6.2B.

Analytical parameters are given in Table 6.1. The LOD was determined empirically, by progressively measuring more diluted concentrations of the analyte. The LOD was the lowest concentration whose signal could be clearly distinguished from the blank. Moreover, the LOQ was calculated as 3.3

times the LOD (LOQ = 3.3LOD). Additionally, RSD values were obtained for 3 replicates at 61 mM of glucose [27].

Table 6.1. Analytical figures of merit for glucose quantification with Pt-graphite line electrode at -0.4 V and 0.2 V and GOx/Pt-graphite biosensor at -0.35 V.

Parameter	Pt-graphite line		GOx/Pt-graphite biosensor
	-0.4 V	0.2 V	-0.35 V
Sensitivity ($\mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$)	0.69 ± 0.06	0.24 ± 0.02	105 ± 3
Intercept ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	-175 ± 3	-5.6 ± 0.9	10.9 ± 1.4
r	0.996	0.999	0.992
N	6	6	13
n	3	3	3
Linear range (mM)	0-82	0-82	0.0-0.9
LOD (mM)	6.6	4.8	0.010
LOQ (mM)	21.8	15.9	0.033
RSD (%)	5.7	7.7	9
(n = 3; C = 61 mM)			

Glucose levels in perspiration fluids are lower than the LOD achieved with this electrode, therefore these results are not applicable to perspiration samples. However, the proposed sensor may be used to quantify glucose in other physiological fluids like blood where glucose levels can reach 19 mM in diabetic patients [11].

Although enzyme-free electrochemical determination of glucose concentration is preferable, enzyme use can greatly improve the lack of selective catalytic activity and low sensitivity towards glucose, which is due

to the slow kinetic of glucose oxidation. Enzymatic quantification of glucose through H_2O_2 reduction should improve the sensitivity and LOD compared to glucose quantification with the non-enzymatic containing electrode. To accomplish this aim, we first evaluated the behavior of graphite and Pt-graphite line electrodes towards H_2O_2 reduction (Figure A-6.3).

3.2. Pt-graphite line biosensors. Glucose detection.

Electrochemical behavior of GOx/Pt-graphite line electrode towards glucose additions was investigated by CV and chronoamperometry. Figure 6.3A shows the voltammograms obtained with the GOx/Pt-graphite line electrode in PBS (dashed line) and in a solution of 25 mM glucose (solid line). The peaks related to H_2O_2 oxidation and reduction are clearly visible at 0.6 V and -0.2 V, respectively, indicating that glucose oxidation is catalyzed by GOx, producing H_2O_2 by the further re-oxidation of GOx by molecular oxygen.

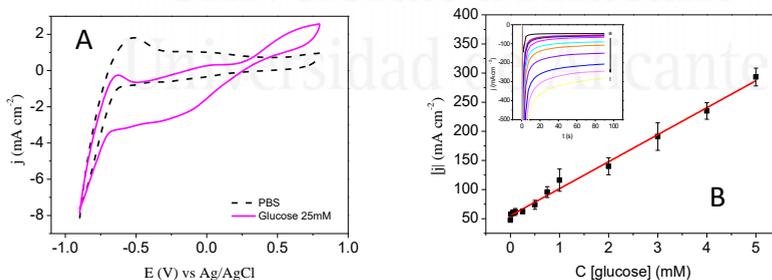


Figure 6.3. A-B) Electrochemical behavior of GOx/Pt-graphite line electrode: A) cyclic voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in PBS containing 25 mM glucose (solid line). $v_{\text{scan}} = 0.05 \text{ V s}^{-1}$. B) Calibration curve obtained representing the linear range. Inset: $j-t$ curves at -0.2 V obtained on increasing glucose concentrations: 0 mM (a), 0.01 mM (b), 0.05 mM (c), 0.1 mM (d), 0.25 mM (e), 0.5 mM (f), 0.75 mM (g), 1 mM (h), 2 mM (i), 3 mM (j), 4 mM (k) and 5 mM (l). $E_i = 0 \text{ V}$. $E_f = -0.2 \text{ V}$.

In order to find the optimum potential at which sensitivity towards H_2O_2 reduction is the highest, chronoamperometry was performed at 0.0 V, -0.1 V and -0.2 V. According to the sensitivity values (results not shown), it was decided to perform the chronoamperometry at -0.2 V. Figure 6.3B Inset includes the j - t curves obtained for successive additions of glucose, with concentrations between 0 and 5 mM.

Chronoamperometries were performed three times at each concentration in order to determine analytical parameters. The calibration curve is shown in Figure 6.3B.

3.3. Stretchable GOx/Pt-graphite biosensor

Before GOx immobilization, in order to ensure that the device is applicable to human skin and the deformations experienced, stretching tests were performed to determine the maximum strain that sensors can withstand without losing their detection properties. Device stretchability was evaluated by resistance measurements and by CV of $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ probe. The results show that the device can be elongated up to 75% of its initial length without variations in its electrochemical behavior (Figure A-6.4). Moreover, it has been checked that the sensor can be fixed on human skin.

3.3.1. Glucose detection in standard solutions

Figure 6.4A presents the voltammograms obtained between -1.1 and 0.6 V for the GOx/Pt-graphite biosensor in a PBS solution (dashed line) and in a 0.9 mM glucose solution (solid line). In the presence of glucose, cathodic and anodic waves are observed at -0.35 V and 0.0 V, corresponding to the

reduction and oxidation of H_2O_2 , respectively. Concerning the stretchable GOx/Pt-graphite biosensor, the cathodic signal related to H_2O_2 appears at lower potentials (-0.35 V vs -0.2 V) due to the Ag/AgCl pseudo-reference electrode used.

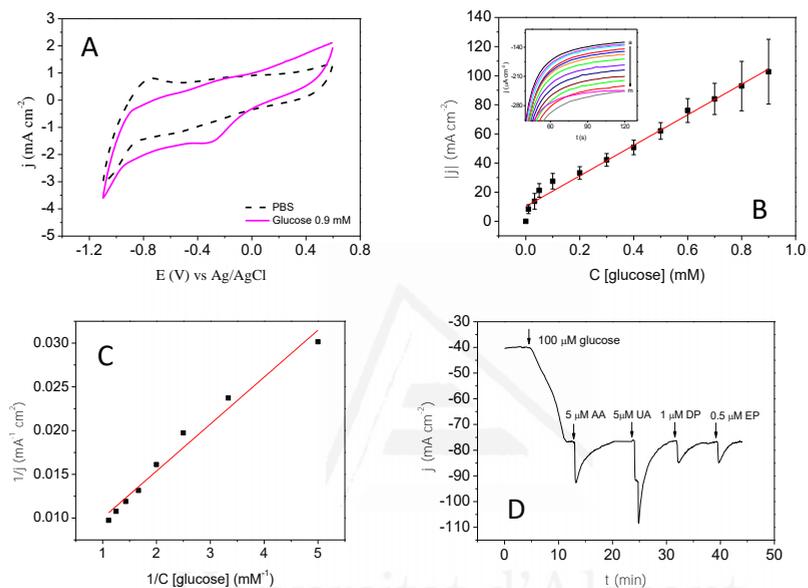


Figure 6.4. A-B) Electrochemical behavior of the stretchable GOx/Pt-graphite biosensor: A) cyclic voltammograms in PBS (0.25M, pH 7.0) (dashed line) and in 0.9 mM glucose solution (solid line). $v_{\text{scan}} = 0.05 \text{ V s}^{-1}$. B) Calibration curve representing the linear range. Inset: j - t curves at -0.35 V obtained on increasing glucose concentrations from 0 mM (a) 0.01 mM (b), 0.03 mM (c), 0.05 mM (d), 0.1 mM (e), 0.2 mM (f), 0.3 mM (g), 0.4 mM (h), 0.5 mM (i), 0.6 mM (j), 0.7 mM (k), 0.8 mM (l) and to 0.9 mM (m). $E_i = 0.0 \text{ V}$. $E_r = -0.35 \text{ V}$. C) Evaluation of enzyme immobilization by Michaelis constant. D) j - t curve showing the effect at spiking levels of 10 μM AA, 5 μM UA, 1 μM DP and 0.5 μM EP on a solution containing 100 μM glucose at -0.35 V. $E_i = 0.0 \text{ V}$.

Chronoamperometry at -0.35 V was carried out for the glucose concentration range between 0 and 0.9 mM in PBS (Figure 6.4B Inset), and the corresponding calibration curve is shown in Figure 6.4B. Due to the heteroscedastic data obtained (Figure 6.4B), a weighted regression model was applied. It is noteworthy that such data processing is not only used to

determine the slope and the intercept of the calibration plot or the concentration of samples, but also to estimate the confidence limits for those concentrations. These are much more realistic than those obtained by the unweighted regression method [27].

The LOD was determined empirically, by progressively measuring more diluted concentrations of the analyte. The LOD was the lowest concentration whose signal could be clearly distinguished from the blank. Moreover, the LOQ was calculated as 3.3 times the LOD ($LOQ = 3.3LOD$). The RSD values were obtained for 3 replicates at 0.5 mM glucose concentration [27]. All analytical parameters obtained for the reported method are shown in Table 6.1. This enzymatic detection significantly improved the sensitivity and LOD compared to the method using direct glucose oxidation on Pt-graphite line electrode (Figure 6.3B and Figure 6.4B). The new biosensor proved adequate for the normal levels of glucose in perspiration fluids for diabetic patients and also for healthy people [11].

The developed stretchable biosensor greatly improves both the electrochemical and analytical parameters obtained with other biosensors using similar electroactive material to that used in the proposed biosensor. Kudo et al. [28] developed a flexible biosensor based on a Pt WE able to quantify H_2O_2 . However, the amount of glucose was quantified by applying a much higher potential (0.55 V), with the consequent interference of AA and UA. Besides, the sensitivity they obtained was lower than that achieved in the present work. Another flexible glucose sensor based on graphene [29] achieves adequate sensitivity, but with a working range between 3.3 mM and 10.9 mM. These levels are higher than glucose levels in samples to

which these stick-on sensors can be applied, like perspiration or tears, and have been improved with the proposed stretchable biosensor. Table A-6.1 shows a more extensive comparison between glucose biosensors reported in the last years with the GOx/Pt-graphite biosensor developed in this work. Moreover, in order to evaluate the efficiency of GOx immobilization, we found that the double reciprocal plot (Figure 6.4C) could be correlated with the Lineweaver–Burk equation:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{max}C_{glucose}} \quad \text{Equation 6.1}$$

Where I_{ss} is the steady-state current reached after glucose addition, $C_{glucose}$ is the glucose concentration in the bulk and I_{max} is the maximum current observed at glucose saturation. The apparent Michaelis constant K_m^{app} was evaluated to be at around 1.2 mM, which is lower than the values obtained from GOx in solution and in agreement with reported enzymatic GOx-based sensors [30]. This result illustrates the effective immobilization as the low K_m^{app} value of the electrode shows the high affinity towards glucose substrate.

Biosensor specificity was studied considering that perspiration consists of a plethora of metabolites and electrolytes [31]. The stretchable GOx/Pt-graphite biosensor was evaluated towards potential interferences commonly present in physiological fluids by studying their effect at -0.35 V. AA, UA, DP and EP were added in a 100 μ M glucose solution, to reach concentrations of 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, and 0.5 μ M, respectively (Figure 6.4D), which are higher than the common concentration of these analytes in human perspiration [32]. No interference from these biochemical

compounds was observed. Note that the perturbation in the j-t curve after the addition of different aliquots is due to the homogenization of the solution. However, the current is recovered in a few minutes reaching the initial current density.

Stretching tests were performed to determine the maximum strain that the GOx/Pt-graphite biosensor can withstand without losing its glucose detection performance. Figure A-6.4C shows the images of the GOx/Pt-graphite biosensor for strain levels between 0 and 75%. Figure A-6.4D presents the j-t curves obtained after strain levels of 25%, 50% and 75% were applied 50 times each. A RSD of 1.3% ($C_{\text{glucose}} = 0.9 \text{ mM}$; $n = 4$) was obtained, indicating that the GOx/Pt-graphite biosensor could be subjected to a strain of 75% without significant modifications of its sensing properties.

3.3.2. Human perspiration samples

Perspiration samples were collected from five healthy volunteers (men and women between 26 and 38 years old with no medical history of diabetes) after an intense sport session and were investigated by chronoamperometry at -0.35 V . The final application of the biosensor is to be fixed to the human skin; however, the sensors were tested in the analysis of perspiration samples collected in glass containers by volunteers. Perspiration samples were filtered to eliminate solid contamination by skin collected by the volunteers during sampling. No dilution or treatment was performed to simulate sampling conditions during real-time measurement. The glucose concentrations calculated are shown in Table 6.2. No matrix effects were found allowing the use of the external calibration curve

obtained above for all samples measured (Figure 6.4B). Also, the perspiration sample from Subject I was used to evaluate inter-sensor reproducibility by using three different biosensors, giving a RSD of 23%. This value, which is due to the handmade biosensor printing process, could be greatly reduced by the use of a printing machine during sensor manufacture. Trueness of the method was checked by measuring the glucose concentration in perspiration samples spiked at 0.4 mM of glucose, leading a recovery between 71 and 84% (Table 6.2). Even though GOx activity is dependent on pH (optimal values between 5.0 and 7.0) and temperature (optimal values between 25 and 60°C) [22], the results obtained for glucose recoveries indicate that these parameters do not significantly vary the enzyme activity.

Table 6.2. Determination of glucose in real perspiration samples.

Subject	Initial (mM)	Spiked (mM)	Found (mM)	Recovery (%)
I	0.27 ± 0.06	0.4	0.56 ± 0.05	83
II	0.14 ± 0.06	0.4	0.38 ± 0.07	71
III	0.31 ± 0.07	0.4	0.59 ± 0.11	84
IV	0.17 ± 0.07	0.4	0.46 ± 0.09	81

Perspiration sample from subject V was taken to compare glucose levels obtained under fasting and post-meal conditions, giving concentrations of (0.14 ± 0.06) mM and (0.53 ± 0.10) mM, respectively. Perspiration sample under fasting conditions was collected 12 h after the last food intake, while

the post-meal sample was collected 30 min after substantial glucose intake. In both cases, perspiration samples were gathered after 30 min of intense sport activity. The results show large differences between glucose levels under fasting and post-meal conditions.

Currently, there is no commercially available diagnostic tool for measuring glucose levels in perspiration. Therefore, to compare and benchmark the performance of the biosensor developed in this work, we used a Contour XT[®] glucose measurement meter from Bayer, a commercially available diagnostic tool for measuring glucose in peripheral blood. This analysis was done for a limited number of samples (i.e., 6 samples). Blood samples of volunteers were collected prior to the sport activities necessary to generate the perspiration samples. To do so, a time interval of 30 min was observed between the perspiration and blood samples collection. To quantify the correlation between the concentrations in both fluids, we used the R^2 -value of regression analysis for the correlation between the response of the sensors under development and the response from the Contour XT[®] results. Figure 6.5 presents the correlation plot, where the sensors showed an R^2 -value of 0.968, indicating a significant correlation in the results obtained.

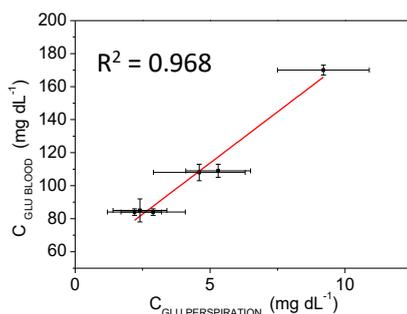


Figure 6.5. Comparison of Contour XT[®] glucose meter ($C_{\text{GLU BLOOD}}$) and our biosensor ($C_{\text{GLU PERSPIRATION}}$) using regression analysis for perspiration and blood samples.

4. Conclusions

In the present work, an all-printable, highly stretchable, and low-cost device, based on Pt-decorated graphite (stretchable Pt-graphite sensor, 3 wt% Pt), was developed for non-invasive glucose monitoring in physiological fluids. The synthesized Pt-graphite electrode was exhaustively characterized by CV, TEM, FESEM and XPS.

Glucose in phosphate buffer solution (0.25 M PBS, pH 7.0) was investigated by two different methods: non-enzymatic and enzymatic detection. On the one hand, enzyme-free detection was carried out by recording the glucose oxidation current by chronoamperometry at -0.4 V and 0.2 V. The results obtained at negative potential show the higher sensitivity of this method. The sensitivity obtained with this sensor was $(0.69 \pm 0.06) \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$, and a LOD of 6.6 mM. Given the LOD achieved, this non-enzymatic sensor is useful to detect glucose in physiological fluids like blood, where glucose levels are higher than in other human fluids like perspiration.

On the other hand, enzymatic detection was performed after immobilization of GOx on a Pt-decorated graphite electrode (GOx/Pt-graphite biosensor). Glucose quantification in this case, was done by measuring the current of H_2O_2 reduction via chronoamperometry at -0.35 V. The latter method greatly improved the sensitivity obtained with the enzyme-free sensor. Excellent results have been obtained for glucose quantification in phosphate buffer solution (0.25 M PBS, pH 7.0), where the GOx/Pt-graphite biosensor exhibits a low LOD of 10 μM with a linear range between 0 and 0.9 mM. The sensitivity obtained with this enzymatic sensor was $(105 \pm 3) \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$. Repeatability was studied for a 0.5 mM glucose

concentration providing a RSD of 9%. No interferences of UA, AA, DP and EP were observed, confirming the high specificity of the sensor for glucose. Stretchability tests were performed to study the influence of stress-strain on detection performance. The results show that the GOx/Pt-graphite biosensor can be stretched up to 75% of its original size with a RSD for glucose detection of 1.3% and it has been checked that the sensor can be fixed in human skin.

Inter-sensor reproducibility and the trueness of the proposed method were investigated by the analyses of human perspiration samples, providing a RSD of 23% and a recovery between 71 and 84%. Moreover, statistically significant differences were found in the glucose levels obtained from perspiration samples collected under fasting and post-meal conditions. Finally, results obtained by measuring glucose concentrations in human perspiration with a GOx/Pt-graphite biosensor and human blood with a commercial glucose meter indicate a significant correlation between these values.

These data indicate that the present stretchable biosensor is competitive, making it an alternative stick-on, non-invasive device for the continuous quantification of glucose levels in human perspiration samples.

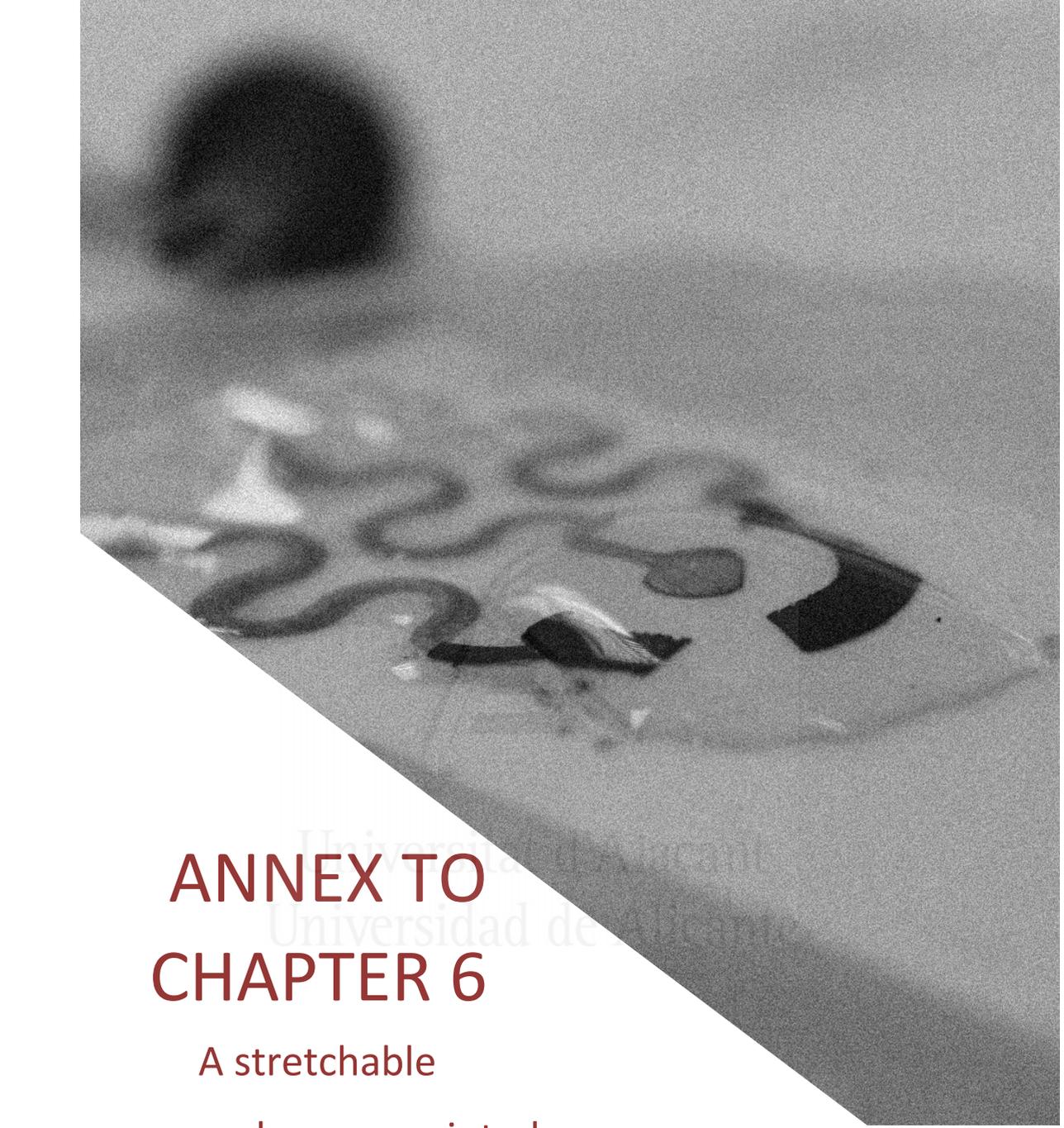
5. References

- [1] H.-C. Wang, A.-R. Lee, Recent developments in blood glucose sensors, *J. Food Drug Anal.*, 23 (2015) 191–200.
- [2] J. Zhu, Z. Zhu, Z. Lai, R. Wang, X. Guo, X. Wu, G. Zhang, Z. Zhang, Y. Wang, Z. Chen, Planar amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized by chitosan film on prussian blue layer, *Sensors*, 2 (2002) 127–136.

- [3] U. Harborn, B. Xie, R. Venkatesh, B. Danielsson, Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood, *Clin. Chim. Acta*, 267 (1997) 225–237.
- [4] G. Cui, J.H. Yoo, B.W. Woo, S.S. Kim, G.S. Cha, H. Nam, Disposable amperometric glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip, *Talanta*, 54 (2001) 1105–1111.
- [5] A.L. Galant, R.C. Kaufman, J.D. Wilson, Glucose: detection and analysis, *Food Chem*, 188 (2015) 149–160.
- [6] A. Lodgotra, P. Verma, S.S. Raj, Estimation of salivary and serum biomarkers in diabetic and non diabetic patients - A comparative study, *J. Clin. Diagn. Res.*, 10 (2016) ZC56-ZC61.
- [7] A. Rabti, W. Argoubi, N. Raouafi, Enzymatic sensing of glucose in artificial saliva using a flat electrode consisting of a nanocomposite prepared from reduced graphene oxide, chitosan, nafion and glucose oxidase, *Microchim. Acta*, 183 (2016) 1227–1233.
- [8] C. Liu, Y. Sheng, Y. Sun, J. Feng, S. Wang, J. Zhang, J. Xu, D. Jiang, A glucose oxidase-coupled DNAzyme sensor for glucose detection in tears and saliva, *Biosens. Bioelectron*, 70 (2015) 455–461.
- [9] K. Mitsubayashi, M. Suzuki, E. Tamiya, I. Karube, Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 27–34.
- [10] P. Labroo, Y. Cui, Flexible graphene bio-nanosensor for lactate, *Biosens. Bioelectron*, 41 (2013) 852–856.
- [11] J. Moyer, D. Wilson, I. Finkelshtein, B. Wong, R. Potts, Correlation between sweat glucose and blood glucose in subjects with diabetes, *Diabetes Technol. Ther*, 14 (2012) 398–402.
- [12] H. Lee, T.K. Choi, Y.B. Lee, H.R. Cho, R. Ghaffari, L. Wang, H.J. Choi, T.D. Chung, N. Lu, T. Hyeon, S.H. Choi, D.-H. Kim, A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy, *Nat. Nanotechnol.*, 11 (2016) 566–572.
- [13] K. Sakaguchi, Y. Hirota, N. Hashimoto, W. Ogawa, T. Hamaguchi, T. Matsuo, J.-I. Miyagawa, M. Namba, T. Sato, S. Okada, K. Tomita, M. Matsuhisa, H. Kaneto, K. Kosugi, H. Maegawa, H. Nakajima, A. Kashiwagi, Evaluation of a Minimally Invasive System for Measuring Glucose Area under the Curve during Oral Glucose Tolerance Tests: Usefulness of Sweat Monitoring for Precise Measurement, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 7 (2013) 678–688.

- [14] W. Jia, A.J. Bandodkar, G. Valdés-Ramírez, J.R. Windmiller, Z. Yang, J. Ramírez, G. Chan, J. Wang, Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 6553–6560.
- [15] J. Kim, S. Imani, W.R. de Araujo, J. Warchall, G. Valdés-Ramírez, T.R.L.C. Paixão, P.P. Mercier, J. Wang, Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics, *Biosens. Bioelectron.*, 74 (2015) 1061–1068.
- [16] A.J. Bandodkar, W. Jia, C. Yardımcı, X. Wang, J. Ramirez, J. Wang, Tattoo-based noninvasive glucose monitoring: a proof-of-concept study, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 394–398.
- [17] A.J. Bandodkar, I. Jeerapan, J. Wang, Wearable chemical sensors: present challenges and future prospects, *ACS Sens.* 1 (2016) 464–482.
- [18] H. Zhang, X. Bo, L. Guo, Electrochemical preparation of Pt nanoparticles supported on porous graphene with ionic liquids: Electrocatalyst for both methanol oxidation and H₂O₂ reduction, *Electrochimica Acta*, 201 (2016) 117–124.
- [19] Z. Peng, H. Yang, Designer platinum nanoparticles: control of shape, composition in alloy, nanostructure and electrocatalytic property, *Nano Today*, 4 (2009) 143–164.
- [20] R. Wilson, A.P.F. Turner, Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosens. Bioelectron.*, 7 (1992) 165–185.
- [21] J. Wang, CHAPTER 3 - Electrochemical glucose biosensors, in: *Electrochem. Sens. Biosens., Their Biomed. Appl.*, Academic Press, San Diego, 2008: pp. 57–69.
- [22] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase — an overview, *Biotechnol. Adv.*, 27 (2009) 489–501.
- [23] V.G. Prabhu, L.R. Zarapkar, R.G. Dhaneshwar, Electrochemical studies of hydrogen peroxide at a platinum disc electrode, *Electrochimica Acta*, 26 (1981) 725–729.
- [24] Z. Pu, R. Wang, J. Wu, H. Yu, K. Xu, D. Li, A flexible electrochemical glucose sensor with composite nanostructured surface of the working electrode, *Sens. Actuators B Chem.*, 230 (2016) 801–809.
- [25] J. Wang, J. Liu, L. Chen, F. Lu, Highly selective membrane-free, mediator-free glucose biosensor, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3600–3603.
- [26] S. Park, H. Boo, T.D. Chung, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors, *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 46–57.

- [27] Miller, J., Miller, J.C., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson, 6th edition, 2010.
- [28] H. Kudo, T. Sawada, E. Kazawa, H. Yoshida, Y. Iwasaki, K. Mitsubayashi, A flexible and wearable glucose sensor based on functional polymers with Soft-MEMS techniques, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2006) 558–562.
- [29] Y.H. Kwak, D.S. Choi, Y.N. Kim, H. Kim, D.H. Yoon, S.-S. Ahn, J.-W. Yang, W.S. Yang, S. Seo, Flexible glucose sensor using CVD-grown graphene-based field effect transistor, *Biosens. Bioelectron.*, 37 (2012) 82–87.
- [30] M.Y. Vagin, I. Jeerapan, R. Wannapob, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, N. Anwar, T. McCormac, M. Eriksson, A.P.F. Turner, E.W.H. Jager, W.C. Mak, Water-processable polypyrrole microparticle modules for direct fabrication of hierarchical structured electrochemical interfaces, *Electrochimica Acta*, 190 (2016) 495–503.
- [31] C.J. Harvey, R.F. LeBouf, A.B. Stefaniak, Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use, *Toxicol. In Vitro*, 24 (2010) 1790–1796.
- [32] O.M. Ancel Keys, The composition of sweat, with special reference to the vitamins, *J Biol. Chem.*, 27 (1934) 839–848.



ANNEX TO CHAPTER 6

A stretchable
and screen-printed
electrochemical sensor for
glucose determination in human perspiration

1. Graphite and Pt-decorated graphite powder

1.1. Electrochemical characterization

A GC electrode was modified by aqueous dispersion of the Pt-graphite (Pt-graphite/GC electrode) in order to electrochemically characterize the synthesized powder.

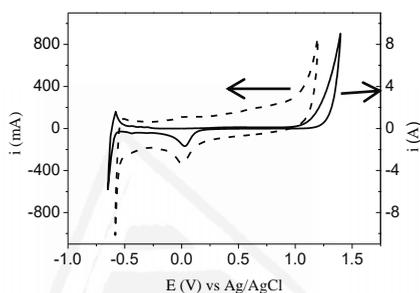


Figure A-6.1. Cyclic voltammograms for a Pt electrode (solid line) and a Pt-graphite/GC electrode (dashed line) in PBS (0.25 M, pH 7.0). $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$.

Figure A-6.1 depicts the voltammograms registered in a PBS solution by the modified electrode (Pt-graphite/GC) and a Pt electrode, for comparative purposes. A reduction peak is observed at around 0 V which corresponds to the reduction of the platinum oxide produced during the positive scan at potentials higher than 1 V. Also, an increase in the current is observed, both the high and low potential limits, corresponding to the oxygen evolution reaction (OER) and the hydrogen evolution reaction (HER), respectively. The voltammogram of the Pt-graphite electrode indicates the presence of Pt and that face that its surface is accessible to the electrolyte.

1.2. Structural characterization

Figure A-6.2 shows the results obtained for the structural characterization of graphite and Pt-graphite powders. Figure A-6.2A and Figure A-6.2B are two representative TEM images of Pt-decorated graphite samples. Figure A-6.2B shows several layers of graphite and a uniform distribution of the Pt-NPs on a graphite surface, with a particle size between 7 and 10 nm. The surface morphology of both powders (graphite and Pt-graphite) was characterized by FESEM. Figure A-6.2C shows a picture of graphite consisting of the stacked graphene layers. Figure A-6.2D exhibits the SEM image of the graphite sample after doping with Pt-NPs. As it can be observed, no morphological differences were found between the two images, indicating that reduction of the Pt precursor did not produce graphite exfoliation.

Pt distribution on graphite was studied from the backscattered electrons (Figure A-6.2E and Figure A-6.2F). The image in Figure A-6.2D and EDX-mappings registered at different regions of the sample (see Figure A-6.2F as an example) show a homogeneous distribution of the Pt on the carbon support. The amount of Pt obtained from EDX is (3.0 ± 0.7) wt%.

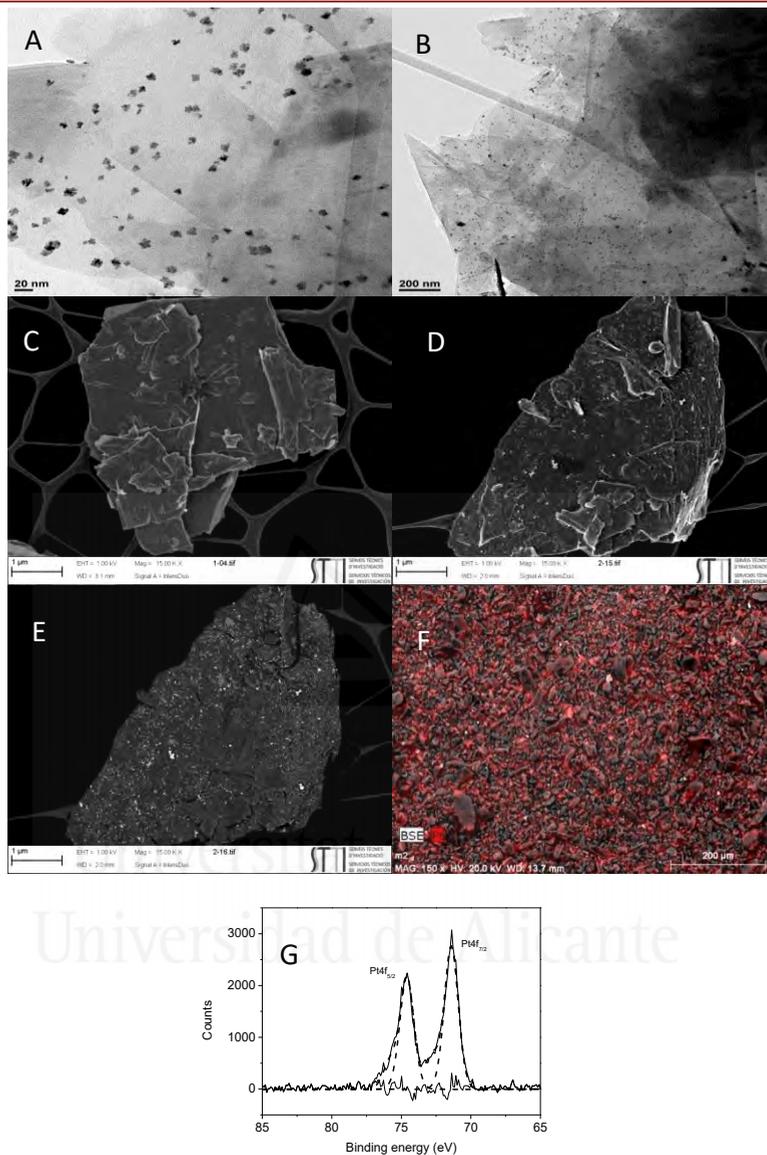


Figure A-6.2. (A-B) TEM images for Pt-graphite powder at different magnifications. (C-F) FESEM images for: C) graphite powder. D-E) Pt-graphite powder (secondary electrons and backscattered electrons, respectively). F) EDX-mapping (Pt-graphite powder). G) XPS spectra for Pt-graphite powder.

The elemental content of carbon, oxygen and Pt was quantified for both samples by XPS. Figure A-6.2G shows the XPS of Pt for the Pt-graphite powder, evidencing the peaks for the Pt 4f_{7/2} and Pt 4f_{5/2} signals, which may be assigned to zerovalent Pt. For the Pt-graphite powder, the XPS results showed a 4.2 wt% Pt, 90.8 wt% C and 5.0 wt% O in the sample.

2. Electrochemical response to H₂O₂ at non-enzymatic Pt-graphite electrodes

Since carbon materials are suitable electrocatalysts for this reaction [1,2], the response of graphite and Pt-graphite line electrodes towards reduction of H₂O₂ has been analysed. Figure A-6.3A and Figure A-6.3B include the voltammograms obtained with both electrodes in PBS solution and in a solution of 5 mM H₂O₂. Figure A-6.3A shows the behavior of graphite line electrode, evidencing that the voltammetric profile does not significantly change in the potential region used (solid line). However, for the Pt-graphite line electrode (Figure A-6.3B), the voltammogram in the presence of H₂O₂ shows a clear oxidation peak above 0.3 V and a reduction current at lower potentials than -0.2 V. Voltammetric responses suggest that Pt is acting as electrocatalyst towards oxidation and reduction of H₂O₂, showing an increase in the signals belonging to these processes.

Then, chronoamperometry at -0.20 V was performed to quantify H₂O₂ through its electrochemical reduction, which is considered an adequate potential taking into account the large difference between the voltammetric signal in the absence and presence of H₂O₂ (Figure A-6.3B).

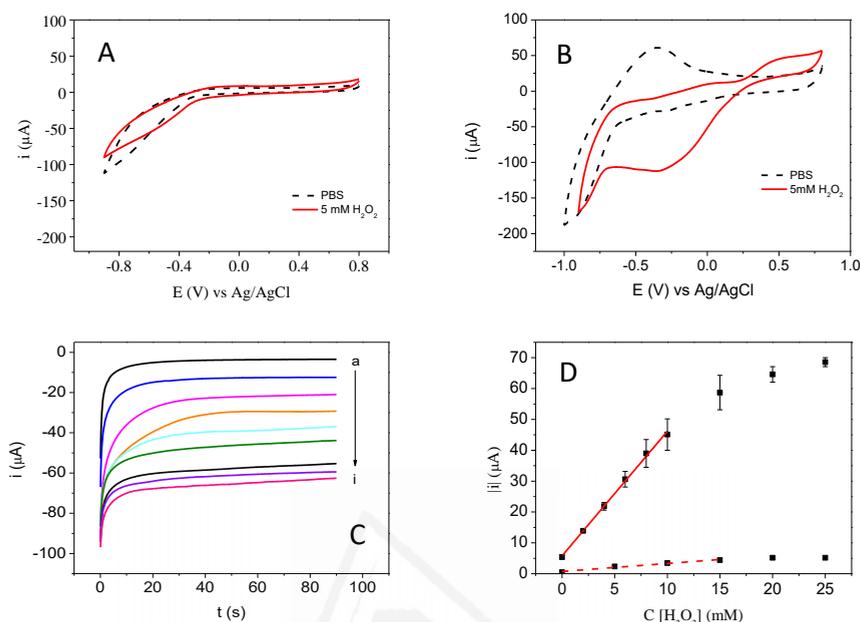


Figure A-6.3. Electrochemical behavior towards H_2O_2 : A-B) cyclic voltammograms in PBS (0.25 M, pH 7.0) (dashed line) and in 5mM H_2O_2 (solid line) for: A) graphite line electrode. B) Pt-graphite line electrode. C) i - t curves obtained with Pt-graphite line electrode to increasing H_2O_2 concentrations from 0 mM (a) to 25 mM (i) with 2 mM (0-10 mM) and 5 mM (10-25 mM) increments. $E_i = 0$ V. $E_f = -0.20$ V. D) Calibration curves obtained for graphite line (dashed line) and Pt-graphite line (solid line) electrodes.

Figure A-6.3C exhibits i - t curves obtained with Pt-graphite line electrode for several additions of H_2O_2 at a concentration range between 0 and 25 mM. The same experiment was performed using graphite line electrode (results not shown). The calibration curves obtained with both electrodes are presented in Figure A-6.3D. The linear functions obtained are represented by Equation A-6.1 (Pt-graphite) and Equation A-6.2 (graphite).

$$|i|(\mu A) = (4.05 \pm 0.09) C_{H_2O_2}(mM) + (4.2 \pm 0.6) \quad \text{Equation A-6.1}$$

$$R = 0.998 \quad (N = 6)$$

$$|i|(\mu A) = (0.37 \pm 0.02) C_{H_2O_2}(mM) + (0.06 \pm 0.11) \quad \text{Equation A-6.2}$$

$$R = 0.993 \quad (N = 4)$$

The results confirm that the presence of Pt significantly enhances the sensitivity of the developed method, justifying the use of a Pt-graphite material as catalytic WE for the detection and quantification of H₂O₂.

3. Pt-graphite stretchable sensor and GOx/Pt-graphite stretchable biosensor

3.1. Stretchability characterization

First of all, the resistance of the Pt-graphite WE and graphite CE was evaluated by using a multimeter, with values (0.3 k Ω cm⁻¹ and 1.0 k Ω cm⁻¹ for Pt-graphite and graphite electrodes, respectively) close to those reported in the literature [3]. The inks were made competitive by combining high-level conductivity with stretching tolerance, even when elongation was applied (resistance increased by 20 % for 75 % strain level).

Secondly, stretchability of the device was evaluated by CV with 10 mM K₄[Fe(CN)₆] as a probe. Thus, the sensor was fixed at one end and was elongated at different strain levels to simulate possible movements of the human skin, such as sport. This process was repeated 50 times at 25%, 50% and 75% strain levels.

Figure A-6.4A shows the images illustrating the strain experiments and the voltammograms recorded after these strains were applied. The redox processes are clearly observed at different strains, thus maintaining its reversibility (Figure A-6.4B). Therefore, the stretchable Pt-graphite sensor can be subjected to a strain up to 75% without any relevant alteration of its electrochemical properties.

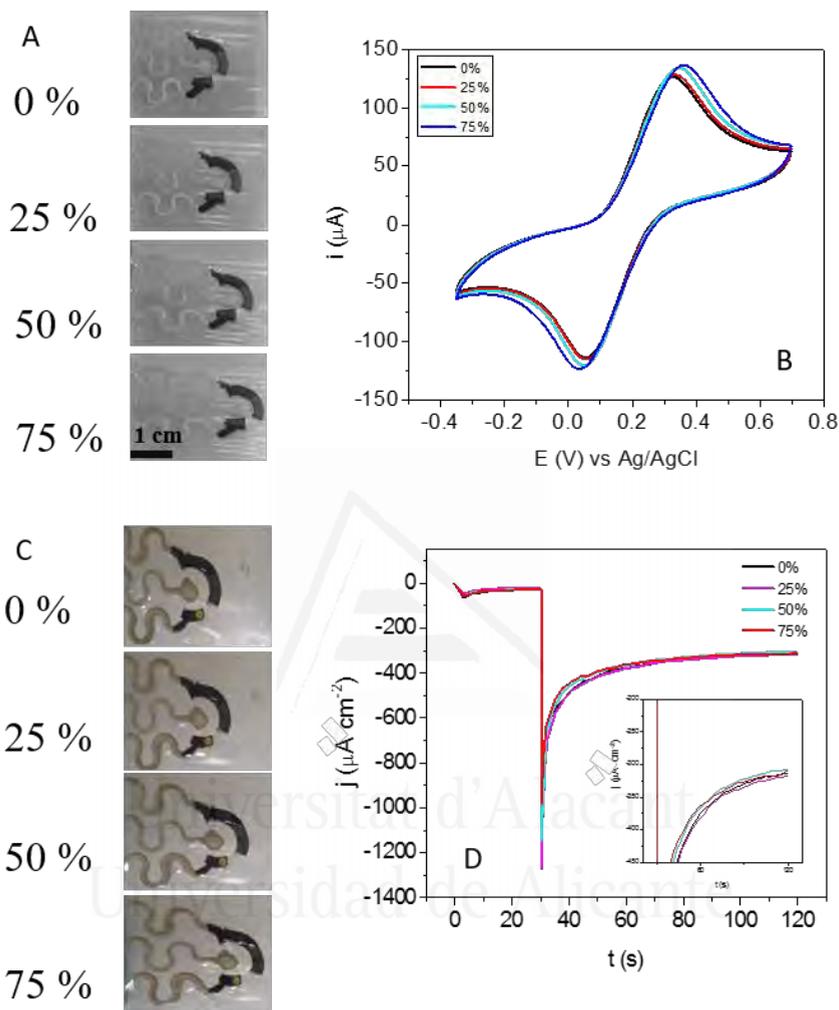


Figure A-6.4. A-B) Pt-graphite sensor: A) images illustrating strain studies applied on stretchable Pt-graphite sensor. B) Cyclic voltammograms in 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (0.25 M PBS, pH 7) after strain was applied 50 times at 0%, 25%, 50% and 75%. $v_{scan} = 0.1 \text{ V s}^{-1}$. C-D) GOx/Pt-graphite biosensor: C) images illustrating strain studies applied on GOx/Pt-graphite biosensor. D) Chronoamperometry at -0.35 V for a 0.9 mM glucose solution after strain was applied 50 times at 0%, 25%, 50% and 75%.

Also, stretching tests were performed to determine the maximum strain that the GOx/Pt-graphite biosensor can withstand without losing its glucose

detection performance (Figure A-6.4C and Figure A-6.4D). Chronoamperometry at -0.35 V was performed after strains of 0%, 25%, 50% and 75% had been applied 50 times each.

Finally, Table A-6.1 compares the results obtained in this work with others previously reported.

Table A-6.1. Comparison of analytical characteristics for several electrochemical glucose sensors.

Electrode	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ cm^{-2})	LOD (μM)	Working range (mM)	Ref.
PET/VACNT-Al foil/PFLO/GOx	65.816	7	0.02-0.5	[4]
PPy/PB/GOx- modified graphite	1.9	-	0.05-0.5	[5]
Au/ZnO-polyamide	14.5	5.5	0.0006-11	[6]
Pt-Ir-alloy-PEEK	2.55	110	0.11-21	[7]
Prussian blue ink (WE)	0.023 cm^2	3	0-100	[8]
GOD/Pt-PMD	(0.01-0.2) $\cdot 10^{-3}$ (cm^2)*	0.06	0.06-2	[9]
Au-PVC/TTF-TCNQ	(45 ± 0.5) cm^2	6.2	0.0-2.0	[10]
GOx/Pt-graphite	105 ± 3	10	0.01-0.9	This work

*This method achieved a non-linear correlation between the current and the concentration. Sensitivity has been calculated for a low concentration (0.1 mM) and for a high concentration (1.5 mM) levels. Both values calculated have been added to Table A-6.1.

This comparison illustrates the fact that the developed electrochemical and stretchable biosensor exhibits enhanced sensitivities, the highest obtained to date, representing therefore a suitable and competitive alternative for the quantification of glucose in perspiration samples. We should highlight that the small amount of Pt used to functionalize the graphite greatly improved the performance obtained, emphasizing the outstanding sensitivity reached.

4. References

- [1] He, X. Luong, J. H. T., N. Zhou, L. E.P., P. Nesteronko, P. N. B., G. Omamogho, J.O. J.D., Porous graphitized carbon monolith as an electrode material for probing direct bioelectrochemistry and selective detection of hydrogen peroxide, *Anal. Chem.*, 84 (5) (2012) 2351–2357.
- [2] N.S. Sangeetha, S. Sriman Narayanan, Hydrogen peroxide sensor based on carbon nanotubes - poly(celestine blue) nanohybrid modified electrode, *Adv. Mater. Res.*, 938 (2014) 263–268.
- [3] J.K. Lee, S.M. Kang, S.H. Yang, W.K. Cho, Micro/Nanostructured Films and Adhesives for Biomedical Applications, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 11 (2015) 2081–2110.
- [4] T.C. Gokoglan, S. Soylemez, M. Kesik, I.B. Dogru, O. Turel, R. Yuksel, H.E. Unalan, L. Toppare, A novel approach for the fabrication of a flexible glucose biosensor: The combination of vertically aligned CNTs and a conjugated polymer, *Food Chem.*, 220 (2017) 299–305.
- [5] A. Ramanavicius, A.I. Rekertaitė, R. Valiūnas, A. Valiūnienė, Single-step procedure for the modification of graphite electrode by composite layer based on polypyrrole, Prussian blue and glucose oxidase, *Sens. Actuators B Chem.*, 240 (2017) 220–223.
- [6] R.D. Munje, S. Muthukumar, S. Prasad, Lancet-free and label-free diagnostics of glucose in sweat using Zinc Oxide based flexible bioelectronics, *Sens. Actuators B Chem.*, 238 (2017) 482–490.

- [7] J. Li, P. Koinkar, Y. Fuchiwaki, M. Yasuzawa, A fine pointed glucose oxidase immobilized electrode for low-invasive amperometric glucose monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, 86 (2016) 90–94.
- [8] A.J. Bandonkar, W. Jia, C. Yardımcı, X. Wang, J. Ramirez, J. Wang, Tattoo-based noninvasive glucose monitoring: a proof-of-concept study, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 394–398.
- [9] H. Kudo, T. Sawada, E. Kazawa, H. Yoshida, Y. Iwasaki, K. Mitsubayashi, A flexible and wearable glucose sensor based on functional polymers with Soft-MEMS techniques, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2006) 558–562.
- [10] G. Sánchez-Obrero, M. Cano, J.L. Ávila, M. Mayén, M.L. Mena, J.M. Pingarrón, R. Rodríguez-Amaro, A gold nanoparticle-modified PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination, *J. Electroanal. Chem.*, 634 (2009) 59–63.





CONCLUSIONS

- THE METHOD IS EASY TO BE APPLIED
- IT ALLOWS THE QUANTIFICATION OF AA AND UA
- SUITABLE SELECTIVITY AND SENSITIVITY
- THE METHOD IS ABLE TO ANALYSE BLOOD SAMPLES
- THE METHOD IS ABLE TO ANALYSE URINE SAMPLES
- THE METHOD IS ABLE TO ANALYSE SWEAT SAMPLES
- SUITABLE STRETCHABILITY
- ADEQUATE LIMITS OF DETECTION
- IT ALLOWS THE QUANTIFICATION OF GLUCOSE IN SWEAT SAMPLES

CAPÍTULO 7

Conclusiones Generales

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y funcionalización de materiales carbonosos nanoestructurados para su aplicación en sensores y biosensores electroquímicos en la determinación de AA y UA, y de glucosa, respectivamente. A continuación se presenta la Tabla 7.1, donde se encuentran comparados los resultados obtenidos con los materiales desarrollados en los Capítulos 3-5. Todos los dispositivos desarrollados en esta Tesis Doctoral están basados en el uso de diferentes materiales carbonosos nanoestructurados como elemento transductor en sensores voltamétricos y cronoamperométricos para la cuantificación de AA y UA en fluidos fisiológicos. Para el cálculo de las sensibilidades de los métodos desarrollados, presentadas en la Tabla 7.1, se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones. En primer lugar, los resultados obtenidos para el electrodo sin modificar (Au-IDA) son aproximados, debido a que no se ha llevado a cabo un estudio detallado de la oxidación de AA y UA sobre los mismos. Por otra parte, los electrodos hCNTs/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA han sido preparados mediante el depósito de 5 μg de material electroactivo sobre el soporte Au-IDA. Además, los potenciales para la oxidación de AA y UA, obtenidos con todos los electrodos, se han referido al electrodo reversible de hidrógeno (RHE).

Los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a una serie de conclusiones que pueden ser organizadas en los siguientes apartados.

Tabla 7.1. Comparación de los sensores para AA y UA desarrollados en la presente Tesis Doctoral.

Electrodo (/Au-IDA)	Técnica	AA			UA			Cuantificación simultánea
		E (V) vs RHE*	Sensibilidad ($\mu\text{A mM}$)	LOD (μM)	E (V) vs RHE*	Sensibilidad ($\mu\text{A mM}$)	LOD (μM)	
Sin modificación	CV ^a	1.1	≈ 1	ND ^c	1.3	≈ 2	ND	NO
Gr-FMN	CV	0.74	ND	ND	0.99	65 ± 3	18	ND
Pt-Gr-FMN	CV	0.7	ND	ND	0.99	123 ± 10	18	ND
Au-GO	CA ^b	0.75	0.830 ± 0.060	1.25	1.0	0.728 ± 0.016	0.65	SI
hCNTs	CV	0.63	1.05 ± 0.10	15	0.945	7 ± 3	15	SI
hCNTs-4ABA	CV	0.70	5.21 ± 0.04	15	0.945	15.0 ± 0.7	15	SI
	CA		22.5 ± 1.0	0.65			21.9 ± 0.7	0.65

*Corresponden a los potenciales a los que se oxidan el AA y el UA cuando ambos están presentes en la disolución.

^a CV: voltimetría cíclica.

^b CA: cronoamperometría.

^c ND: no determinado.

Desarrollo de sensores voltamétricos para la determinación de AA y UA

- Se ha investigado la actividad de cuatro materiales carbonosos nanoestructurados (Gr-FMN, Pt-Gr-FMN, hCNTs y hCNTs-4ABA) como transductores (electrodos) para el desarrollo de sensores voltamétricos para la cuantificación AA y UA.
- Los materiales preparados se han utilizado para modificar redes de microelectrodos interdigitados de Au (Au-IDA), mostrando una actividad electrocatalítica frente a las reacciones de oxidación del AA y UA, ya que éstas ocurren a un potencial menos positivo y con una mayor intensidad de corriente que cuando se emplea el electrodo Au-IDA sin modificar (Tabla 7.1).
- Los cuatro electrodos preparados (Gr-FMN/Au-IDA, Pt-Gr-FMN/Au-IDA, hCNTs/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA) permiten la separación de los picos de oxidación correspondientes al AA y al UA, mientras que estas señales aparecen solapadas cuando se emplea un electrodo Au-IDA (Figura 7.1).

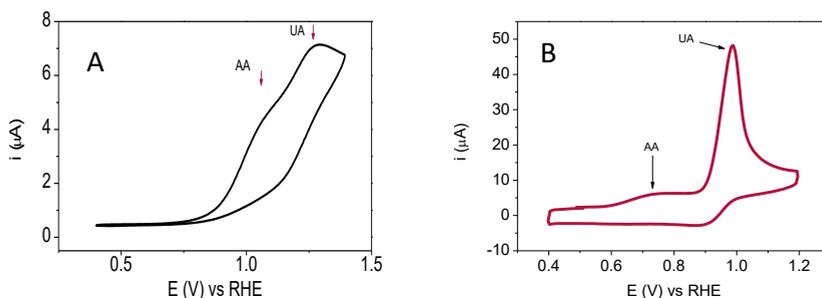


Figura 7.1. Voltametría cíclica en una disolución que contiene AA y UA mediante: A) electrodo Au-IDA sin modificar. B) Electrodo Gr-FMN/Au-IDA.

- La disminución del potencial de oxidación de ambos analitos cuando se emplean los electrodos Gr-FMN/Au-IDA y Pt-Gr-FMN/Au-IDA, está asociada a diversos factores. En primer lugar, una posible interacción de los electrones deslocalizados del grafeno y los analitos daría lugar a esa disminución. Además, la FMN puede actuar como mediador de las reacciones de oxidación del AA y del UA en la superficie electródica mejorando la electrocatálisis del proceso. Por otra parte, el aumento de la intensidad de corriente de los procesos de oxidación del AA y UA se atribuye principalmente a las excepcionales propiedades del grafeno, entre ellas, la elevada área superficial que presenta. Por otra parte, la presencia de Pt en el electrodo Pt-Gr-FMN/Au-IDA también conlleva un aumento en la intensidad de corriente producida por la oxidación de AA y UA. Esta mejora puede asociarse al gran poder catalítico del Pt sobre diversas reacciones, pero también al aumento del área superficial que supone el empleo de nanopartículas.

- Los resultados obtenidos mediante los electrodos Gr-FMN/Au-IDA y Pt-Gr-FMN/Au-IDA para la cuantificación de UA en presencia de AA permiten afirmar que el AA no interfiere en la cuantificación voltamétrica de UA, proporcionando sensibilidades, LODs e intervalos de linealidad adecuados para la determinación de UA en muestras biológicas como sangre u orina. La presencia de Pt en uno de los electrodos da lugar a una mayor sensibilidad, como consecuencia de su actividad electrocatalítica, siendo por tanto el material con resultados más prometedores.

- La disminución del potencial de oxidación del AA y del UA sobre los electrodos hCNTs/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA puede ser debida a la estructura de los CNTs que presentan una elevada concentración de sitios activos. Estos producen, además, un aumento en la intensidad de corriente que está asociado a la elevada área superficial que presentan. Además, la presencia de grupos funcionales carboxílicos y sobre todo nitrogenados presentes en el electrodo hCNT-4ABA/Au-IDA también pueden favorecer las interacciones entre los analitos en estudio y la superficie del electrodo. El incremento en la corriente es más acusado en el electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA, debido, por una parte, a la incorporación de grupos funcionales ricos en nitrógeno durante el proceso de funcionalización al que han sido sometidos los CNTs. Además, durante la funcionalización del material se alcanzan potenciales suficientemente altos como para provocar la oxidación del material carbonoso, con la consecuente generación de nuevos sitios activos.

- Los resultados obtenidos mediante el electrodo hCNTs/Au-IDA permiten llevar a cabo la cuantificación voltamétrica y simultánea de AA y UA, sin interferencia de un analito sobre el otro. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo con el electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA, la presencia de UA interfiere en la cuantificación de AA, debido a una mayor afinidad del material electródico por el UA. El AA, por lo contrario, no interfiere en la cuantificación de UA. Por tanto, para llevar a cabo la cuantificación simultánea de ambos analitos, es necesario preparar las rectas de calibrado para AA con disoluciones patrón que contienen la cantidad de UA existente en la muestra que se está analizando. Las sensibilidades y LODs obtenidos

con los electrodos hCNTs/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA, hacen posible la cuantificación de AA y UA en fluidos fisiológicos como sangre u orina.

- Haciendo una comparación de los cuatro materiales/electrodos estudiados (Gr-FMN/Au-IDA, Pt-Gr-FMN/Au-IDA, hCNTs/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA), puede concluirse que los electrodos basados en grafeno muestran los resultados más prometedores, como consecuencia de las excepcionales propiedades que presenta este material. Además, la presencia de nanopartículas metálicas (Pt-NPs) conlleva una importante mejora de los resultados obtenidos (Tabla 7.1).

Desarrollo de sensores amperométricos para la determinación de AA y UA

- Se ha investigado la actividad de dos materiales carbonosos nanoestructurados (Au-GO y hCNTs-4ABA), preparados mediante estrategias de síntesis simples y rápidas, para ser empleados como transductores (electrodo) en el desarrollo de sensores cronoamperométricos para la determinación de AA y UA.

- Los electrodos preparados a partir de estos materiales (Au-GO/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA) muestran una actividad electrocatalítica frente a las reacciones de oxidación del AA y del UA, mediante la disminución del potencial al cual se oxidan y en el caso del electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA, aumentando también la intensidad de corriente generada en la reacción, con respecto al electrodo Au-IDA sin modificar (Tabla 7.1).

- Esta disminución del potencial de oxidación, en el caso del electrodo Au-GO/Au-IDA puede ser atribuida a las interacciones entre el GO y los analitos,

así como a la presencia de Au-NPs, que presentan actividad electrocatalítica frente a las reacciones de oxidación de AA y UA. Sin embargo, la sensibilidad obtenida mediante este electrodo es muy similar a la que proporciona el electrodo Au-IDA sin modificar, lo cual podría ser atribuido a la escasa conductividad que presenta el material. Cuando se realiza el estudio con el electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA la interacción entre los analitos con los electrones π desapareados favorece las reacciones de oxidación del AA y más especialmente con el UA, por eso la disminución del potencial es más acusada para la oxidación de este analito. El empleo de hCNTs como material electródico, produce un incremento, aún mayor que el electrodo Au-GO/Au-IDA, en la intensidad de corriente correspondiente a la oxidación de AA y UA, con respecto a las obtenidas con un electrodo Au-IDA. Este hecho se justifica con el gran número de sitios de borde que presentan los hCNTs, junto con los nuevos sitios activos que se han generado gracias al proceso de funcionalización al que ha sido sometido el material carbonoso.

- Estudios voltamétricos mediante el electrodo Au-GO/Au-IDA de una mezcla de AA y UA indican que no es posible separar los picos correspondientes a la oxidación de ambos analitos. No obstante, el estudio mediante cronoamperometría simulando las concentraciones de AA y UA existentes en fluidos fisiológicos, permite afirmar que el UA no interfiere en la medida del AA, mientras que el AA si produce una corriente de oxidación al potencial al que se oxida el UA. Sin embargo, mediante el uso de rectas de calibrado de UA preparadas con la concentración de AA presente en el fluido que se analiza, este inconveniente queda solventado. Resultados similares se observan en el estudio de la cuantificación simultánea de AA y

UA con el electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA, siendo el AA un interferente en la determinación de UA. Sin embargo, con este electrodo se han desarrollado dos métodos diferentes, el primero de ellos consistente en una celda electroquímica que permite el uso de pequeños volúmenes (gota) y un segundo método en el que la celda tiene un volumen de 40 mL. Esto permite adoptar una estrategia simple consistente en diluir la muestra hasta un nivel en el que el AA se encuentre en una concentración inferior a su LOD, de modo que no interfiera en la cuantificación de UA. En caso de no poderse llegar a tal dilución, la estrategia empleada con el electrodo Au-GO/Au-IDA, puede ser utilizada también en este caso.

- Ambos electrodos (Au-GO/Au-IDA y hCNT-4ABA/Au-IDA) han sido evaluados frente a la posible interferencia producida por otros compuestos normalmente presentes en los fluidos fisiológicos (dopamina, epinefrina y glucosa) mediante cronoamperometría a los potenciales a los que se oxidan el AA y el UA. Es posible concluir que estos compuestos no interfieren en la cuantificación de AA y UA.

- Los parámetros analíticos obtenidos mediante los electrodos Au-GO/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA proporcionan sensibilidades y LODs adecuados para la cuantificación de ambos analitos en fluidos fisiológicos como sangre u orina. Sin embargo, los resultados obtenidos con el electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA muestran sensibilidades dos órdenes de magnitud superiores a las obtenidas con el electrodo Au-GO/Au-IDA, indicando la gran habilidad de los hCNTs funcionalizados para diferenciar entre diferentes concentraciones de AA y UA (Tabla 7.1).

- El electrodo Au-GO/Au-IDA se ha empleado de forma exitosa en el análisis de una muestra de orina mediante el método de adición de estándar. El empleo de este método presenta el inconveniente de tener que preparar una recta de calibrado para cada una de las muestras preparadas, ya que la recta debe contener la propia muestra. Sin embargo, el electrodo hCNTs-4ABA ha sido empleado en una gran variedad de matrices (sudor, orina, serum y sangre) mediante el uso de una calibración externa, que permite un mayor número de análisis en menor tiempo. Esto supone una gran mejora con respecto a los métodos existentes, ya que ninguno de ellos permite la cuantificación de AA y UA a partir del análisis directo de una muestra de sangre, cuyo único tratamiento ha sido una dilución.
- Mediante comparación de los resultados obtenidos con ambos electrodos (Au-GO/Au-IDA y hCNTs-4ABA/Au-IDA) se pueden extraer diversas conclusiones (Tabla 7.1).
- Por una parte, las figuras de mérito obtenidas con ambos electrodos son más prometedoras en el caso del electrodo hCNTs-4ABA/Au-IDA, como consecuencia de las excepcionales propiedades de los CNTs. Por otra parte, el análisis de muestras reales permite afirmar, principalmente, que a pesar de la actividad electrocatalítica que presentan las Au-NPs, mejorando los parámetros electroquímicos y analíticos, son fácilmente contaminables por los fluidos fisiológicos, especialmente por aquellos cuyas matrices son realmente complejas (orina, suero y sangre).

Desarrollo de dispositivos para la determinación de glucosa

- Se ha desarrollado un material electródico (Pt-graphite line electrode), basado en una tinta de grafito decorado con Pt-NPs y manualmente impresa, para ser usado como electrodo de trabajo en la cuantificación de glucosa mediante su oxidación directa. La cuantificación de glucosa se lleva a cabo mediante cronoamperometría a -0.4 V y 0.2 V, obteniéndose la mejor sensibilidad con el menor potencial. Los resultados obtenidos hacen posible su aplicación en fluidos fisiológicos de pacientes diagnosticados de diabetes.
- Dos materiales electródicos (graphite line electrode y Pt-graphite line electrode), basados en tintas de grafito manualmente impresas, han sido evaluados frente a la reacción de reducción del H_2O_2 , en la que el electrodo que contiene Pt-NPs muestra una excelente electroactividad.
- Se ha desarrollado un biosensor electroquímico y flexible para la determinación de glucosa en muestras de sudor mediante la cuantificación de la reducción de H_2O_2 , presentando una alternativa no invasiva a los actuales glucómetros comerciales. El biosensor se prepara mediante la impresión sucesiva de diferentes tintas, siendo el *Pt-graphite* y la GOx, el transductor y receptor, respectivamente.
- Se han obtenido excelentes resultados para la sensibilidad y LOD, y además se ha comprobado que el sensor puede fijarse en la piel, lo que permite su aplicación en el análisis in-situ de glucosa en sudor humano. Se ha llevado a cabo el análisis de seis muestras de sudor en sujetos sin ninguna enfermedad diagnosticada, encontrándose grandes diferencias entre los

niveles de glucosa antes y después de la ingesta de comida para un mismo sujeto. Además, mediante el uso de un glucómetro comercial también se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre para estos mismos sujetos, encontrándose que existe una correlación entre los niveles de este analito en sangre y en sudor.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

