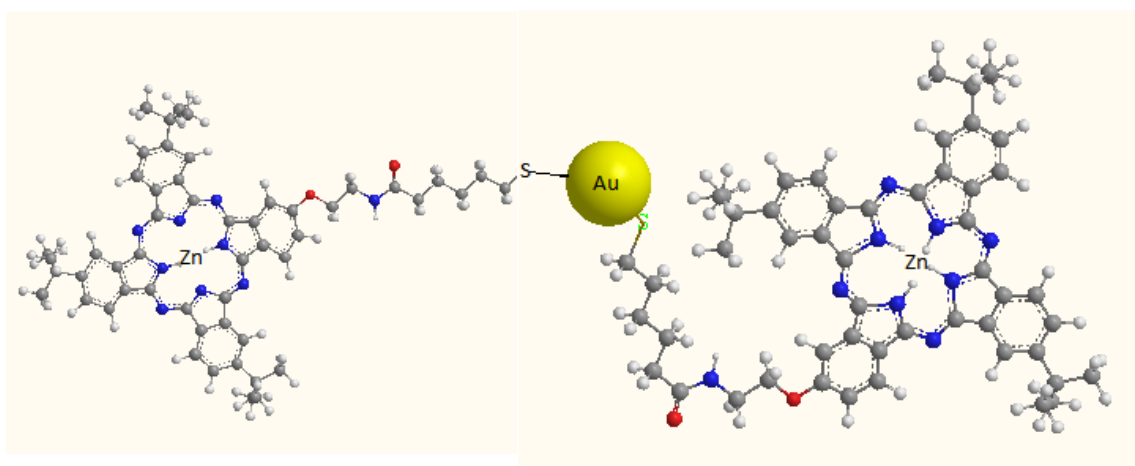


Universidad de Valladolid

Escuela de Ingenierías Industriales

Departamento de Química Física y Química Inorgánica



DESARROLLO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS BASADOS EN LA COMBINACIÓN DE AuNP Y FTALOCIANINAS

Ana Isabel Ruiz Carmuega

2016

Agradecimientos.

A lo largo del tiempo empleado para la realización de este trabajo han sido muchas las personas que me han ayudado. A todas ellas deseo expresarles mi más sincero agradecimiento.

A mi directora de proyecto la Dra. María Luz Rodríguez Méndez catedrática de la Universidad de Valladolid, por darme la oportunidad de compaginar trabajo y proyecto con toda la comprensión por su parte que eso conlleva.

A la Dra. Ángela Sastre, catedrática de la Universidad de Miguel Hernández (Elche) por proporcionarnos la ftalocianina ZnPc1

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Al Consejo Interinstitucional de Ciencia y Tecnología (ref: AGL-2015-67482-R) y a la Junta de Castilla y León (ref: VA_032U13) por su financiación.

A todos mis compañeros de laboratorio, por hacer que el tiempo pasado allí haya sido muy agradable, por sus consejos, y su acogida.

A mi familia, a mis padres y a mi hermano, por el ánimo que me han trasmitido en todo momento, porque ser mis mayores admiradores igual que yo lo soy de ellos.

A mis amigos y en especial a mi pareja Marcos, por apoyarme en todas mis decisiones incluso cuando saben que no son las más acertadas.

Y por último a mis sobrinos, Luis, Javier, David, Mara, Saúl y Joel por hacer que cada día valga la pena.

Muchas gracias a todos ellos por estar en mi vida.

Resumen

El diseño de sistemas híbridos combinando diferentes materiales electrocatalíticos es muy atractivo para el desarrollo de sensores electroquímicos. Ya se conoce el efecto electrocatalítico que las nanopartículas y las ftalocianinas pueden tener en la detección de antioxidantes. Recientemente se han combinado con éxito AuNPs y ftalocianinas con el objeto de obtener sensores electroquímicos que mejorasen sus propiedades electrocatalíticas. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de sensores voltamétricos donde se combinan una ftalocianina y nanopartículas de oro con el fin de obtener un efecto electrocatalítico sinérgico entre ambos. Para este propósito se obtuvo un complejo formado por nanopartículas de oro funcionalizadas con bromuro de tetraoctilamonio unidas covalentemente a 2-{2'-[(5''-Acetilpentiloxo)amino]ethoxi}-9(10),16(17),23(24)-tri-tert-butilftalocianinato Zn(II) [ZnPc1] a través de enlaces tiol ($\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc.}$) Por otro lado se preparó también una mezcla de ambos componentes (sin unión covalente). Se prepararon sensores químicamente modificados con el complejo y con la mezcla usando spin-coating como técnica e ITO como sustrato. Los materiales se caracterizaron por espectroscopía de absorción UV-visible y microscopía electrónica de transmisión TEM.

El comportamiento sensitivo de estos sensores se caracterizó con voltametría cíclica donde el electrodo modificado se usó como electrodo de trabajo. Se midió frente a catecol la respuesta electroquímica de los electrodos recubiertos con los complejos. Con el propósito de compararlos también se midieron las propiedades sensitivas de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ y ZnPc1 por separado.

Tanto la mezcla como el complejo covalente muestran una actuación similar en cuanto a la cinética, lo que indica que el enlace covalente no interviene directamente en la transferencia de electrones.

Se ha demostrado que ambos compuestos, la mezcla y el complejo covalente, muestran un efecto sinérgico aumentando la sensibilidad del sensor. Se obtuvieron límites de detección del orden de 10^{-7}M .

PALABRAS CLAVE: nanopartículas, AuNP, ftalocianinas, efecto sinérgico, sensores voltamétricos, voltametría cíclica.

Abstract

The design of hybrid systems combining different electrocatalytic materials is very attractive for the development of electrochemical sensors. It is well known that nanoparticles and phthalocyanines can have electrocatalytic effect on the detection of antioxidants. Recently, AuNPs and phthalocyanines have been successfully mixed to obtain electrochemical sensors with improved electrocatalytic properties.

The objective of this work was to develop voltammetric sensors where phthalocyanines and nanoparticles are combined in order to obtain synergistic electrocatalytic effect between them. For this purpose, a complex formed by tetraoctylammonium bromide-gold nanoparticles ($\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$) linked covalently to 2-{2'-[(5''-Acetylthiopentyloxo)amino]ethoxy}-9(10),16(17),23(24)-tri-tert-butylphthalocyaninate Zn(II) [ZnPc1] through thiol bonds was obtained ($\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$). On the other hand a mixture of both compound (not covalently linked) was also prepared. Sensors chemically modified with the complex and the mixture were prepared using the spin coating technique using ITO glass as the substrate. Films were characterised by UV-Vis spectroscopy and TEM microscopy.

The sensing behaviour was characterized by cyclic voltammetry where the modified electrodes were used as the working electrode. The electrochemical response of the electrodes covered with the complexes was tested towards catechol. For comparison purposes, the sensing properties of $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NPs}$ and ZnPc1 were tested separately.

Both, the mixture and the covalent complex show similar performance. This indicates that the covalent link does not intervene directly in the electron transfer.

It has been demonstrated that both composites show synergistic effects enhancing the sensitivity of the sensors. Detection limits of 10^{-7} were obtained.

KEY WORDS: nanoparticles, AuNP, phthalocyanine, synergistic effects, voltammetric sensor, cyclic voltammetry

INDICE

1. Justificación y objetivos	1
2. Estado del arte	3
2.1. Materiales electrocatalíticos	4
2.1.1. Ftalocianinas	4
2.1.2. Nanopartículas. Importancia y aplicaciones	8
2.2. Sensores voltamétricos	11
2.3. Importancia de los antioxidantes	22
3. Materiales y métodos	25
3.1. Reactivos	25
3.2. Síntesis AuNP funcionalizadas con bromuro de tetraoctilamonio	35
3.3. Funcionalización de Au ^{NBr} NP con ftalocianina de zinc ZnPc1	26
3.4. Caracterización estructural	28
3.5. Fabricación de sensores voltamétricos. Spin Coating	29
3.6. Obtención de datos electroquímicos	30
3.6.1. Cálculo de los límites de detección	31
3.6.2. Cálculo de transporte de los electrones.	31
4. Resultados	34
4.1. Caracterización estructural de los materiales empleados: Au ^{NBr} NP, ZnPc1, Au ^{NBr} NP +ZnPc1 y Au ^{NBr} NP-S-ZnPc1	34
4.2. Respuesta electroquímica del electrodo sin modificar	39
4.3. Respuesta electroquímica del electrodo modificado con Au ^{NBr} NP	42
4.4. Respuesta electroquímica del electrodo modificado con ZnPc1	46
4.5. Respuesta electroquímica del electrodo modificado con mezcla Au ^{NBr} NP +ZnPc1	49
4.6. Respuesta electroquímica del electrodo modificado con Au ^{NBr} NP-S-ZnPc1 unidos covalentemente	52
4.7. Resumen y comparación de los sensores	56
5. Conclusiones	59
6. Bibliografía	61

1. Justificación y objetivos

Este proyecto se ha llevado a cabo dentro del grupo UVaSens y se presenta como parte del Master de Nanociencia y Nanotecnología Molecular.

El grupo UvaSens es un equipo multidisciplinar formado por Químicos, Físicos e Ingenieros, que tiene su sede en la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid, cuyas líneas de investigación están dirigidas al desarrollo y diseño de sensores, principalmente aplicados al análisis y control de calidad de bebidas y alimentos (vinos, aceites, pescados, etc.)

Dentro de este análisis de alimentos los fenoles son una familia de gran interés ya que contribuyen a sus propiedades organolépticas, además de su comportamiento como antioxidantes en estos compuestos.

Hasta la fecha en UVaSens, se han estado desarrollando sensores modificados con diferentes materiales electrocatalíticos, tales como nanopartículas metálicas o ftalocianinas entre muchos otros compuestos. A día de hoy, se están abriendo nuevas líneas de investigación para obtener sensores con nuevas propiedades, y una de estas nuevas estrategias es la combinación de materiales electrocatalíticos.

Dicho esto, el objetivo general de este trabajo es el desarrollo de nuevos sensores voltamétricos, basados en la combinación de ftalocianinas y nanopartículas como materiales electrocatalíticos. Los objetivos específicos son:

- Síntesis de nanopartículas por un método clásico de capado.
- Unión covalente de ftalocianina-nanopartícula.
- Caracterización de estos nuevos materiales electrocatalíticos mediante espectroscopía UV-visible, y microscopía de transmisión electrónica.
- Desarrollo de sensores electroquímicos voltamétricos con dichos compuestos mediante la técnica de spin coating usando ITO como sustrato.
- Caracterización de estos sensores a través de la evaluación de su respuesta a catecol (un antioxidante conocido) en voltametría cíclica, mediante el cálculo del límite de detección y el mecanismo del proceso.
- Búsqueda de efecto sinérgico entre ambos materiales electrocatalíticos.

2. Estado del arte

La nanociencia y nanotecnología trabajan con nanomateriales, que son aquellos donde al menos una de sus dimensiones debe ser inferior a los 100 nm [1].

En torno a los años 80, aparecieron nuevas técnicas experimentales que convirtieron rápidamente a la nanociencia en un importante campo científico, entre estas técnicas, se puede hablar de la microscopía de barrido con efecto túnel (STM, del inglés Scanning Tunneling Microscope) o la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés Atomic Force Microscope), que permitieron observar los materiales a escala atómica y, después, poder manipular átomos individuales [1].

A pesar, de los múltiples campos donde actúa o puede actuar la nanotecnología, se pueden destacar seis grandes grupos donde presenta un mayor impacto: química, física, ingeniería, informática, biología y medicina [1]

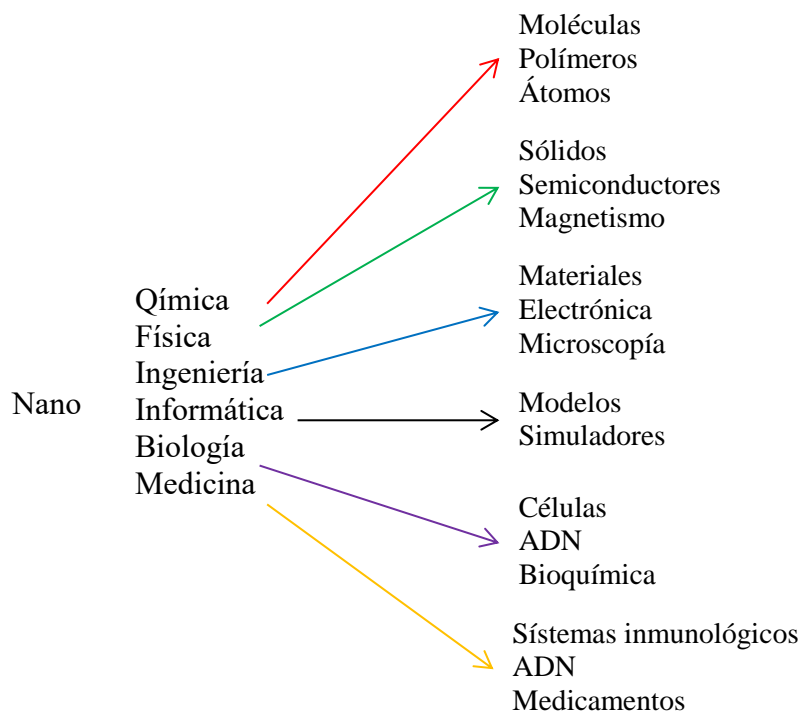


Fig 1. Esquema representativo de las áreas de más aplicación de la nanociencia y la nanotecnología.

Actualmente, la mayoría de las aplicaciones emplean nanomateriales cuyo papel es fundamentalmente pasivo, ya que se emplean para mejorar las prestaciones de otros

materiales existentes. Uno de los retos de las investigaciones actuales, consiste en dar al elemento 'nano' un papel más activo como por ejemplo en el desarrollo de sensores con diferentes materiales. Es aquí donde se va a centrar este trabajo (como ya se ha comentado) en el desarrollo de sensores voltamétricos modificados con distintos materiales electrocatalíticos.

Por tanto se hablará en primer lugar de materiales electrocatalíticos y posteriormente de sensores voltamétricos y cómo pueden modificarse estos sensores.

2.1 Materiales electrocatalíticos

Un material electroactivo es aquel que se oxida o se reduce cuando se le aplica una diferencia de potencial. Si además hablamos de material electrocatalítico es aquel material que cataliza el proceso redox de otra sustancia.

Se ha demostrado que los materiales de dimensiones en escala nanométrica exhiben propiedades química, físicas y electrónicas únicas [2]. El estudio de estas propiedades se ha convertido en un área cada vez más importante de la ciencia. La alta relación superficie/volumen de los nanomateriales hace que sean altamente deseables como uso en electrocatalizadores.

Existe gran diversidad de materiales electrocatalíticos como porfirinas, nanotubos de carbono, perilenos, polímeros conductores o semiconductores, grafeno, ftalocianinas, nanopartículas etc. Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado una ftalocianina y nanopartículas, por tanto se hará una introducción a lo que estos nanomateriales representan.

2.1.1 Ftalocianinas

Una ftalocianina (Pc) es un macrociclo plano simétrico formado por cuatro unidades isoindólicas unidas por sus posiciones 1,3 a través de átomos de nitrógeno (fig. 2)

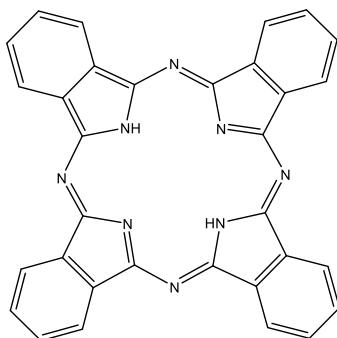


Fig 2. Anillo de ftalocianina

Su estructura consta de 42 electrones π que se extienden sobre 32 átomos de carbono y 8 de nitrógeno. La deslocalización electrónica tiene lugar preferentemente sobre el sistema del anillo interior, de manera que la ftalocianina se considera formalmente como un sistema aromático formado por 16 átomos y 18 electrones π , en la que se encuentran condensados cuatro anillos de benceno que conservan su estructura electrónica [3].

La molécula más sencilla es la ftalocianina sin metal central, también conocida como libre (H_2Pc , fig.2) cuya estructura ofrece múltiples posibilidades de modificación como la introducción de diferentes iones metálicos, ligandos axiales o coordinación a sistemas aromáticos diferentes (fig. 3). Esta versatilidad les sitúa en un lugar destacado dentro de los materiales moleculares. Los átomos de hidrógeno de la cavidad central de la ftalocianina pueden reemplazarse por más de 70 elementos de la tabla periódica dando origen a las metaloftalocianinas (MPc, Fig.3) [4]

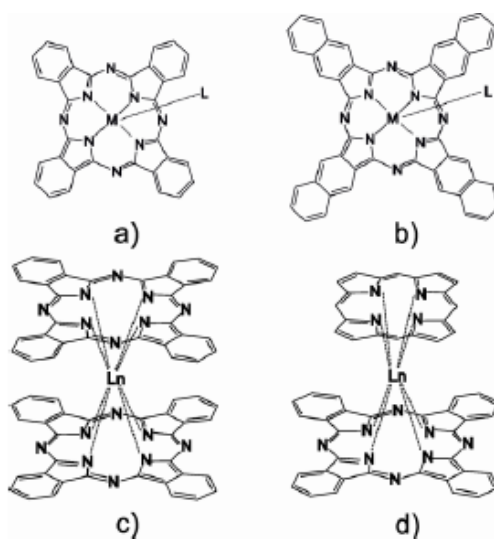


Fig 3.a) Metaloftalocianina, b) Naftalocianina, c) Bisftalocianina de lantánico, d) Ftalocianina-porfirinera heteroléptica.

Existen estructuras más complejas en las cuales los anillos de ftalocianina forman dímeros, trímeros o estructuras poliméricas, donde los anillos de Pc se encuentran unidos mediante enlace covalente [4,8].

En los últimos años se han sintetizado múltiples compuestos de ftalocianina mediante uniones covalentes con diferentes tipos de moléculas de interesantes propiedades, entre las que se incluyen fulerenos [9] y perilenos [10]. El vasto número de derivados de ftalocianinas y ftalocianinas modificadas sintetizadas hasta ahora se explica gracias a esta versatilidad de posibilidades de unión. Son cada vez más empleadas como materiales sensibles debido también sus propiedades, a continuación se citan algunas de ellas [11]:

- *Semiconductividad*: Las MPcs se comportan como semiconductores de tipo p cuando están dopadas con oxígeno, presentando conductividades en el rango 10^{-10} a 10^{-12} S·cm⁻¹ a 300K.
- *Propiedades Electroquímicas*: Poseen interesantes propiedades electroquímicas, electrocatalíticas y electrocromáticas [9]. La naturaleza del ión del metal central, la clase de ftalocianina y la presencia de sustituyentes en el anillo aromático influyen directamente en los potenciales electroquímicos a los cuales tienen lugar las oxidaciones y reducciones. Los cambios en el estado de oxidación están acompañados generalmente de cambios en el espectro electrónico. Las MPcs muestran también una actividad electrocatalítica en la electrooxidación de numerosos compuestos tales como tioles, fenoles, aminas, hidrógeno peróxido, etc [9,11-13]. Las propiedades electroquímicas y electrocatalíticas de las ftalocianinas otorgan a dichos materiales características muy atractivas en el desarrollo de sensores electroquímicos para el análisis de líquidos (motivo por el que se han elegido).
- *Propiedades Ópticas*: Las ftalocianinas en disolución presentan bandas de absorción en la región de 400-700 nm con coeficientes de extinción molar de aproximadamente 2×10^5 M⁻¹.cm⁻¹ debido al sistema π conjugado que poseen [15] (Esta propiedad será desarrollada un poco más adelante). Algunos derivados presentan también bandas en la región NIR, coincidentes con las

longitudes de onda que se emplean en telecomunicación. La interacción de las ftalocianinas con compuesto aceptores y donadores de electrones originan cambios reversibles en el espectro de absorción electrónica [9, 14]. Por este motivo, han sido empleadas tradicionalmente como colorantes y pigmentos en la industria textil y de las pinturas. Además, el elevado coeficiente de extinción de las ftalocianinas posibilita su uso como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica del cáncer[17-19]

- *Otras Propiedades:* Las ftalocianinas poseen alta estabilidad térmica y química. Muchos complejos no presentan descomposición por debajo de los 500°C cuando se encuentran a vacío. Además, los ácidos y bases fuertes no afectan a MPcs. Por último, probablemente una de las propiedades más interesantes es que se pueden preparar electrodos químicamente modificados con ftalocianinas mediante diferentes técnicas, dando lugar a gran variedad de sensores [16], propiedad que aprovecharemos en este trabajo.

Retomando sus propiedades ópticas: El espectro de UV-visible de una ftalocianina presenta dos bandas de absorción bien diferenciadas, la banda Q y la banda B o Soret [20].

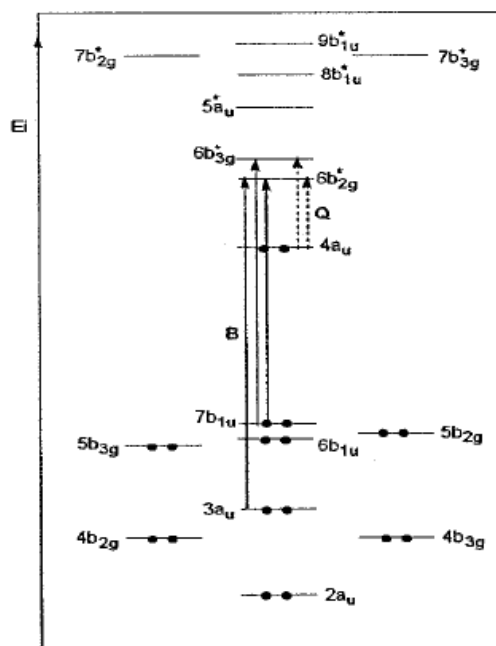


Fig.4. Diagrama energético de orbitales moleculares de una ftalocianina y las transiciones energéticas permitidas responsables de las bandas Q y B.

La banda Q está asociada a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ HOMO-LUMO entre orbitales de simetría a_u y b_g , respectivamente. Esta banda aparece generalmente entre 620-700 nm y es la responsable del color azul o verde de estos compuestos. En el caso de las ftalocianinas libres la banda Q aparece desdoblada, debido a la existencia de un LUMO con dos orbitales moleculares no degenerados (simetría D_{2h} del compuesto). En el caso de los complejos metalados, (simetría D_{4h} del sistema), la degeneración de los orbitales componentes del LUMO es total, conduciendo a una única banda Q de absorción en el visible. Por otro lado, la banda Soret es debida a transiciones electrónicas más energéticas relacionada con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ desde orbitales ocupados de simetría b_u y a_u de menor energía hacia el LUMO. Esta banda es el resultado de al menos tres transiciones, observándose una única banda ensanchada (fig. 4). En el espectro se observa también la aparición de una o dos bandas de origen vibrónico, situadas a una longitud de onda menor que la banda Q [21].

2.1.2. Nanopartículas. Importancia y aplicaciones.

El término NP metálica designa a una agrupación de átomos o moléculas que dan lugar a una partícula con dimensiones entre 1 y 100 nm y con nuevas propiedades respecto al material masivo (bulk).

Se han usado una gran variedad de materiales para hacer nanopartículas, desde dendrímeros y liposomas, hasta carbono, sílice, distintos metales y óxidos metálicos [23-24,27].

Las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales dependen de varios factores, pero sobre todo de su forma y tamaño [25,26]

- la relación superficie/volumen aumenta en las NP respecto del material masivo, lo que conlleva a un aumento considerable de la reactividad química. Este fenómeno provoca una aglomeración de las NPs como mecanismo para disminuir su energía superficial, ya que esta energía, se encuentra en exceso en comparación con la energía de formación de las NPs, su inestabilidad termodinámica.

- Los efectos cuánticos se realzan debido al efecto del confinamiento cuántico que modifica las propiedades de electrones y huecos. Por ello las NPs adoptan unas propiedades químicas, ópticas, eléctricas, térmicas y magnéticas únicas [22].

El estudio concreto de NPs metálicas de tamaño inferior a 3 nm, resulta de gran interés debido a que estos clústeres, constituidos por unos cientos de átomos, presentan la particularidad de que su carácter metálico se pierde paulatinamente a medida que el tamaño de la NP metálica disminuye, haciéndose más patente el carácter molecular de esta [28].

Para comprender mejor cómo cambian las propiedades electrónicas de un material metálico al reducir su tamaño, hay que analizar los niveles electrónicos. Se sabe, que la distancia entre los estados energéticos contiguos, aumenta de manera inversa al aumentar el volumen de las partículas. Esto lleva a que el espectro continuo de bandas (que refleja la situación del material masivo bulk), cambie a un conjunto de estados discretos al disminuir el tamaño hasta la escala nanométrica, esto se debe a que las NPs metálicas no pueden ser tratadas como elementos diminutos de un bloque de metal, y la banda de conducción presente en un metal (bulk), está ausente en estos sistemas y por tanto, se dan los estados discretos de banda.

Como consecuencia del cambio del espectro a un estado discreto, se producen profundas modificaciones en las propiedades físicas que dependen, de los electrones, como ocurre en el caso de las propiedades ópticas o magnéticas [29]. Queda de manifiesto que los electrones en esta situación sufren un confinamiento a un número finito de estados energéticos cuánticos disponibles.

Al cambiar las propiedades electrónicas, las propiedades ópticas cambian ya que dependen de los estados electrónicos, verificándose la aparición de dos tipos de fenomenologías:

- a) el efecto cuántico del tamaño (ya comentado), que consiste en un incremento en el espaciado entre los niveles de energía electrónicos, cuando el sistema llega a ser confinado.
- b) la absorbancia de resonancia del plasmón.

El mecanismo para la absorción de luz en pequeñas partículas metálicas se asocia con un fenómeno de excitación coherente y colectiva de los electrones “libres” en la banda de conducción, produciéndose una oscilación en fase que se conoce como resonancia del plasmón. A nivel microscópico, lo que ocurre es que el campo electromagnético alternante de la luz incidente interactúa con la partícula, induciendo una polarización en la superficie de la misma, debida al desplazamiento de los electrones libres con respecto a la red de cationes. La diferencia neta de carga que se genera sobre los bordes de las partículas, actúa como una fuerza restauradora, creando una oscilación dipolar de electrones con una cierta frecuencia. La energía de esta resonancia del plasmón depende tanto de la densidad de electrones libres como del medio dieléctrico que rodea a la partícula, situándose en el rango de la luz visible para metales nobles y confiriéndoles por tanto su color tan característico [26]. La oscilación dipolar, está en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que dependerá del tamaño y forma de las NPs metálicas, es decir, la longitud de onda del plasmón, claramente depende del tamaño de la AuNP.

Se ha hecho una exposición general de las propiedades de las nanopartículas, y todas ellas pueden aplicarse también a las nanopartículas de oro que son las que nos atañen en este trabajo.

Para partículas de oro relativamente grandes, por encima de 3 nm, la posición de la banda del plasmón se sitúa en torno a 520 nm, dando a las suspensiones de nanopartículas de oro un color rojo característico. Mie fue el primero en explicar este color del oro coloidal en 1908, resolviendo la ecuación de Maxwell para una onda electromagnética interactuando con pequeñas esferas metálicas [30].

El caso de las NPs de metales nobles, y especialmente las AuNPs, presentan unas propiedades físicas, químicas, biológicas, eléctricas, ópticas y catalíticas excepcionales, lo que justifica su elección en este proyecto.

Las NPs metálicas se pueden producir de distintos tamaños y formas, así como funcionalizarse, esto es que pueden recubrirse por capas exteriores de diversos compuestos de distinta procedencia en forma de monocapa o multicapa y así ofrecer nuevas características de gran interés para posibles aplicaciones tecnológicas. Además,

estos compuestos funcionalizantes contribuyen a la estabilización de la NP como consecuencia del aumento de la relación superficie/volumen que vuelve inestable a la NP.

La funcionalización de NPs metálicas con ligandos orgánicos es una práctica muy común, usándose como agentes estabilizantes cadenas alquílicas larga a través de grupos funcionales como tioles, carboxilatos, fosfinas o aminas. Pero no todos tienen la misma afinidad hacia el oro o el metal que las forme, los tioles son los más afines, seguido de aminas, fosfitos y bisulfitos. La funcionalización impide por tanto, la agregación de las NPs en disolventes orgánicos y se abre la posibilidad de ejercer un control en el tamaño, forma y monodispersidad (distribución estrecha de tamaños) de estas.

Las NPs mixtas o funcionalizadas se pueden definir como nanomateriales organizados que consisten en dos o más tipos de nanocompuestos individuales [13]. Estos nanocompuestos se pueden unir a través de puentes moleculares orgánicos o inorgánicos. Las AuNPs funcionalizadas mejoran las propiedades superficiales de las AuNPs sin funcionalizar debido a su alto ordenamiento.

Distintos campos como química, ciencia de los materiales, física, medicina, electrónica etc. Se han visto beneficiadas por los avances en la investigación con nanopartículas. Se han encontrado aplicaciones en biología y medicina como marcadores fluorescentes, sondas para DNA, ingeniería de tejidos [31-34], en imagen [35], fotónica [36], y multitud de sensores [36-40] entre otros.

El desarrollo de sensores voltamétricos con AuNPs era uno de los objetivos de este trabajo, por lo que se pasa a ampliar este concepto y sus aplicaciones.

2.2 Sensores. Sensores voltamétricos

La electroquímica es la ciencia que estudia las reacciones químicas que suceden en la interfase de un electrodo (que será un material conductor eléctrico) y un medio electrolítico (que será una disolución donde se produce la conducción iónica ya que contendrá iones libres).

Estado del arte

El mercado pide poder realizar análisis de forma rápida y económica, así como por optimizar la producción mediante análisis en continuo, lo que ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de métodos analíticos que sean compatibles con sus necesidades.

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [41].

Estas características, combinadas con la incorporación de los últimos avances en tecnologías de miniaturización en la fabricación masiva de sensores, hacen de estos dispositivos unas herramientas de gran interés en la industria.

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar [41]:

- Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.)

- Químicos: Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc.

Actualmente, la mayor parte de sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos, pero la necesidad de obtener información química ha favorecido la investigación y el desarrollo de este tipo de sensores.

Tradicionalmente se ha utilizado instrumentación analítica muy sofisticada, tal como cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc., de coste elevado y que requiere especialización por parte del operario. Además, este tipo de equipos son incompatibles con análisis en continuo o pruebas de campo.

Los sensores químicos se presentan como una clara alternativa a las técnicas clásicas, ya que permiten realizar análisis on-line, con una adecuada sensibilidad y fiabilidad.

Los campos donde los sensores químicos han tenido una mayor implantación son principalmente, la biomedicina [39], el medioambiente y, en los últimos años, en la industria alimentaria [40], si bien en otros sectores, como la bioseguridad, se están desarrollando de forma exponencial [42-45].

Un sensor químico es capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica útil [41]. Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero.

El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra, y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor. Éste la transforma, a su vez, de una señal primaria a una señal secundaria procesable fácilmente, generalmente eléctrica u óptica. Existen dos tipos de receptores [46],

- Químicos, la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelatantes, ionóforos, etc.
- Biológicos, cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso, los sensores químicos son denominados biosensores

La clasificación de los sensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta la más aceptada [47].

En este caso se trabajará con un transductor electroquímico donde la señal es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. Los sensores basados en transductores electroquímicos han tenido un gran desarrollo científico. Esto está claramente ligado al hecho de que son dispositivos más robustos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciostatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

Los sensores desarrollados en este trabajo se pueden clasificar como sensores amperométricos.

Este tipo de dispositivos se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de

referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica [48].

Recientemente han aparecido un nuevo tipo de sensores denominados “Sensores Voltamperométricos” que engloban a los sensores desarrollados en este trabajo. Como cabe esperar, estos han sufrido un gran desarrollo gracias a sus múltiples campos de aplicación como medicina [67], biología [68], alimentación [69], electrónica [70], etc.

Permite realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas, variando el potencial de trabajo de forma controlada. Las curvas intensidad-potencial generadas proporcionan analíticamente más información que las curvas de potencial de equilibrio obtenidas bajo condiciones potenciométricas.

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick,

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o,t))}{\delta x} \quad (1)$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa.

La caracterización electroquímica de los sensores desarrollados en este trabajo se ha llevado a cabo mediante voltametría cíclica, por lo que se va a hacer un breve repaso a los fundamentos de esta técnica

Voltametría cíclica

Este tipo de técnica voltamperométrica se caracteriza por la aplicación al electrodo de trabajo, cuyas condiciones son estacionarias y sin agitación de la disolución, de una señal de potencial triangular (fig. 5). El potencial aplicado va desde un potencial inicial (E_0) hasta un potencial final (E_f), en el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, volviendo a su valor original de E_0 . Este ciclo suele darse varias veces, y los

potenciales en los que se da esta inversión de la dirección reciben el nombre de potenciales de inversión.

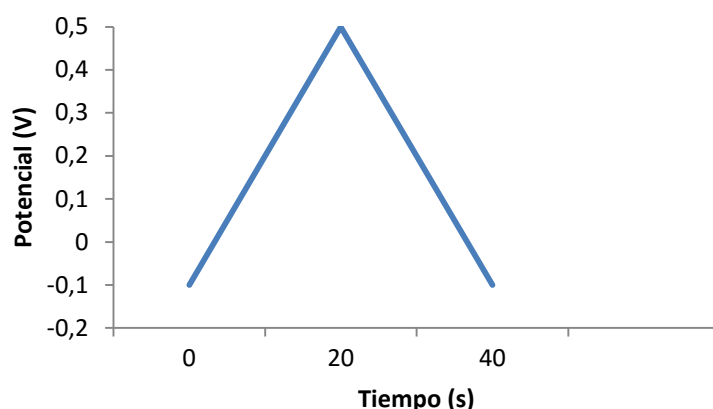


Fig 5. Variación del potencial frente al tiempo en una Voltamperometría cíclica.

El intervalo de potencial de inversión impuesto en cada experimento es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos, y la dirección en la que se produce el barrido va a depender de la composición que presente la muestra.

Es decir, la voltametría cíclica (VC) es un tipo de medida electroquímica potencio-dinámica en la que el potencial del electrodo de trabajo se barre linealmente entre dos valores, E_1 y E_2 , a una velocidad conocida y constante, v . Cuando el potencial llega a E_2 , la dirección del barrido se invierte (en general, a la misma velocidad) hasta llegar a E_1 nuevamente. Este barrido puede repetirse varias veces durante un solo experimento. La corriente en el electrodo de trabajo se grafica en función del potencial aplicado dando origen a un voltamograma cíclico (fig 5) [49].

La respuesta en corriente (onda voltamétrica) depende de la cinética del proceso de electrodo. Si la especie electroactiva difunde hacia (o desde) el electrodo de trabajo desde (o hacia) el seno de la solución y la reacción de transferencia de electrones (reacción redox) es simple y reversible, se puede encontrar una expresión matemática de la relación entre la corriente y el potencial, resolviendo la segunda Ley de Fick para O y R:

$$\frac{\partial C_O}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 C_O}{\partial x^2} \quad (2)$$

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 C_R}{\partial x^2}$$

Donde C_O y C_R son las concentraciones respectivas de O y R, y D_O y D_R , sus coeficientes de difusión, x es la distancia a la superficie del electrodo y t es el tiempo.

Suponiendo que $D_O = D_R = D$, y ciertas condiciones iniciales se llega a la ecuación de Fick expuesta anteriormente (1).

La figura 6 muestra un típico voltamograma cíclico para una reacción reversible en la que inicialmente, sólo la especie reducida está presente en solución. Estas condiciones son las que se encontrarán en este trabajo, donde las voltametrías son llevadas a cabo en una disolución donde inicialmente sólo se encuentra catecol (una especie reducida que puede oxidarse a hidroquinona, como se explicará más adelante).

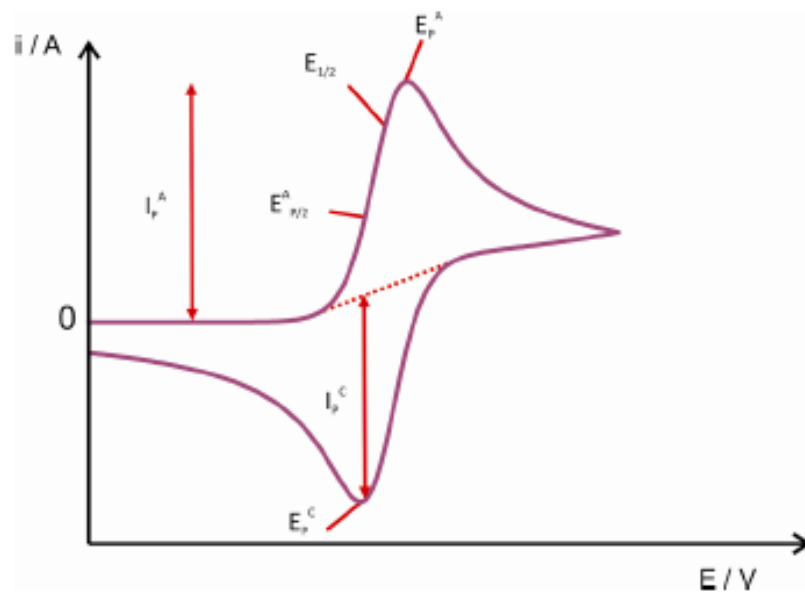


Fig. 6. Voltamograma cíclico para un proceso reversible. E_p^A , E_p^C , e I_p^A , I_p^C son los potenciales y las corrientes de pico anódico y catódico, respectivamente. $E_{1/2}$ es el potencial de media onda y $E_{p/2}^A$ es el potencial cuando la corriente es $I_p^A/2$

Por otro lado, cuando las especies electroactivas están adsorbidas sobre la superficie del electrodo, la forma del voltamograma se modifica, ya que ahora los reactivos y productos no difunden hacia y desde el electrodo para transferir la carga [50].

La superficie de todos estos sensores puede ser modificada con diferentes especies electrocatalíticas como las mencionadas en el apartado 2.1. [80]. Existen distintos tipos de técnicas para realizar esta modificación. El método empleado en la preparación de los sensores determina la morfología, la cual desempeña un papel decisivo en el comportamiento electroquímico de los sensores.

Técnicas de modificación de sensores

Existen métodos de modificación muy variados, desde los clásicos casting o spin-coating, hasta algunos más recientes como layer by layer (LbL) o Langmuir-Blodgett. Algunas de estas técnicas se describen brevemente a continuación.

- ❖ *Casting*: Es un método muy sencillo que consiste en depositar una gota de disolución del material en cuestión sobre la superficie del electrodo. Una vez que el disolvente se evapora se obtiene una película del material sensible [7,11,27]
- ❖ *Adsorción*: La adsorción de las ftalocianinas en materiales carbonosos es uno de los métodos más conocidos debido a su simplicidad. La adsorción de las moléculas sobre la superficie del electrodo se consigue mediante la inmersión de éste en la disolución del compuesto correspondiente en un disolvente adecuado durante varios minutos, lográndose así la adsorción del mismo [7, 11, 27].
- ❖ *Electrodos de Pasta de Carbono* (Carbon Paste Electrode, CPE): Se preparan mezclando grafito (u otro material carbonoso como por ejemplo nanotubos de carbono) con ftalocianina y aceite mineral [51,52] o una resina epoxi. La mezcla se introduce en un tubo y se emplea un hilo metálico como contacto.
- ❖ *Método Sol-Gel*: La técnica sol-gel se ha empleado ampliamente para incorporar moléculas orgánicas y organometálicas en el interior de moléculas inorgánicas denominadas “huésped” (*host*). La principal ventaja en el uso de los materiales

inorgánicos como matriz es que la ftalocianina puede ser “atrapada” en el gel, obteniendo un material con una alta estabilidad [53].

- ❖ *Polimerización electroquímica*: Es un método efectivo para el desarrollo de superficies electroactivas con un control cuidadoso de la velocidad y de la extensión del proceso de polimerización así como de las propiedades químicas y físicas del polímero resultante [54,55]. Uno de los posibles métodos para la modificación de un electrodo es la electropolimerización de monómeros (por ejemplo, tetraaminoftalocianina) sobre una superficie conductora.
- ❖ *Monocapas autoensambladas* (Self-Assembled Monolayers, SAMs): El término selfassembling se refiere a la formación espontánea de monocapas autoorganizadas (self organized) adsorbidas en sustratos sólidos inorgánicos. Se han preparado monocapas autoensambladas de ftalocianinas en las cuales un grupo terminal del anillo aromático (generalmente un grupo tiol) muestra una afinidad específica y reversible hacia un sustrato. De esta manera, se han obtenido SAM basadas en ftalocianinas empleando oro, vidrio, silicio o grafito como sustratos [55, 56].
- ❖ *Langmuir-Blodgett* (LB): Las películas LB se obtienen a partir de la dispersión de una disolución de la molécula objetivo en la superficie de agua contenida en una bañera Langmuir. Una vez transcurrido el tiempo necesario para la evaporación del disolvente se realizan compresiones de las moléculas en la interfase aire/agua con el fin de provocar su orientación en la misma, dando lugar a una monocapa flotante altamente ordenada. Dicha monocapa puede transferirse a un sustrato sólido mediante la inmersión del mismo (dipping) de manera perpendicular en la subfase del agua. Llevando a cabo numerosas inmersiones del sustrato se obtienen multicapas ordenadas del material electroactivo sobre el sustrato, donde el espesor se puede controlar mediante el número de ciclos de inmersión [60, 61,79]
- ❖ *Método Layer by Layer* (LbL): Las monocapas se preparan por deposición alterna de compuestos polielectrolitos catiónicos y aniónicos, (fig. 7)[57-59]. Este método es sencillo y rápido. Además la estructura, composición de la capa

y espesor de la película, puede ser controlada con precisión. La técnica LbL proporciona una herramienta útil para la obtención de nanoestructuras interesantes a partir de la combinación de reactivos tales como nanopartículas de oro, polialilamina y ftalocianina [58].

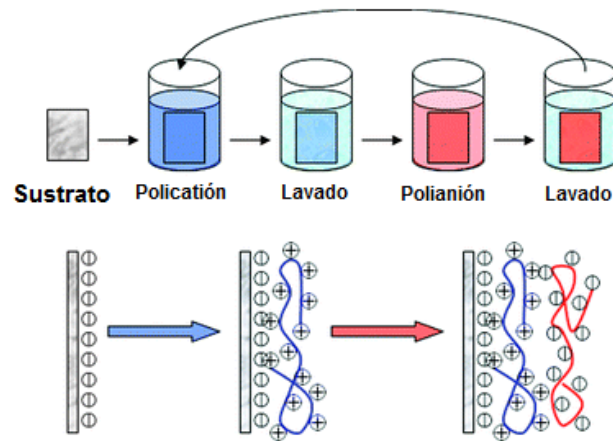


Fig 7. Esquema de la técnica LbL

- ❖ *Spin-Coating*: [62-66]. Ha sido la técnica que se ha empleado para el desarrollo de sensores en este trabajo, y por ello se desarrollará brevemente su fundamento y algunas consideraciones.

Esta técnica de fabricación de películas delgadas conduce a la obtención de recubrimientos bastante uniformes, planos y de alta calidad. Estas características hacen del spin-coating uno de los métodos más prometedores para ser empleado en sensores comerciales económicos. No obstante, pueden surgir en el seno de la película heterogeneidades como consecuencia, entre varias posibles causas, de utilizar disoluciones de partida demasiado complejas o que contengan impurezas.

Esta técnica se materializa en un instrumento llamado spin-coater, el cual posee un torno que inmoviliza al sustrato durante el proceso de rotación. Para preparar una película, el material a depositar se disuelve previamente, siendo muy aconsejable el filtrado de la disolución si se observa algún precipitado o impureza, y evitar así posteriores defectos en la película. A pesar de que existen divergencias entre diferentes autores en cuanto a la delimitación de las etapas en el proceso de spin-coating, éstas pueden unificarse en cuatro:

- Etapa 1: Se deposita un cierto volumen de disolución sobre el sustrato limpio inmovilizado, cubriendo toda la superficie. La cantidad de material que aporta este volumen está en exceso en relación a la cantidad que finalmente formará la película.
- Etapa 2: El sustrato se acelera hasta que se alcanza la velocidad de rotación final deseada. Debido a la fuerza centrípeta generada en el movimiento rotatorio, la disolución se esparce sobre toda la superficie del sustrato, y se expulsa parte de ésta de forma agresiva.
- Etapa 3: El sustrato gira a velocidad constante, y se produce un adelgazamiento gradual del fluido, generalmente uniforme sobre toda la superficie. En función de la tensión superficial y viscosidad del fluido, velocidad de rotación, etc., el espesor final de la película puede ser ligeramente diferente en los bordes del soporte.
- Etapa 4: Durante esta etapa, el soporte continúa girando a velocidad constante, y es la evaporación del disolvente el fenómeno predominante.

Como es evidente, las etapas tercera (control del flujo o caudal) y cuarta (control de la evaporación) son las dos etapas que más impacto tienen en el espesor final de la película, y deben ocurrir de forma simultánea.

En la bibliografía pueden encontrarse trabajos como el realizado por Meyerhofer [71], en el cual se cuantifica la dependencia del espesor con la velocidad de rotación, la viscosidad del fluido y su relación con la velocidad de evaporación.

La técnica spin-coating es utilizada en diversas aplicaciones que requieran cubrir sustratos planos con películas delgadas uniformes. Actualmente muchas tecnologías precisan de la fabricación de películas de gran calidad, para lo cual hacen uso de este método, como por ejemplo: recubrimientos con materiales fotorresistentes para la grabación de plantillas en microcircuitos [73], películas aislantes/dieléctricas para la fabricación de microcircuitos [74], recubrimientos magnéticos (suspensiones de partículas magnéticas, lubricantes, etc.) [75], recubrimientos en pantallas planas (tratamientos antirreflejantes, óxidos conductores, etc.) [76,77] deposición de películas en discos compactos (DVD, CD ROM, etc.) [78], dispositivos electroluminiscentes [72] etc.

A pesar de que el espesor final de la película pueda ser relativamente controlado (mediante la concentración de la disolución, velocidad de rotación, temperatura, etc.), no puede ser monitorizado, siendo además difícil fabricar películas gruesas. Además, una desventaja considerable a tener en cuenta, es que no pueden depositarse películas adicionales si el disolvente puede redissolver la película anterior. Otro inconveniente que plantea esta técnica, cuando es utilizada en aplicaciones industriales, es que no puede usarse cuando la superficie a recubrir posee dimensiones considerables.

La modificación de los sensores (de la superficie de los electrodos) con material electroactivo y electrocatalítico (por ejemplo, ftalocianinas, nanopartículas o polímeros conductores) mejora la selectividad de los electrodos [81-83]. En ellos, los voltamogramas muestran picos de oxidación y reducción asociados tanto a las muestras analizadas como a los materiales sensibles que modifican el electrodo. La interacción entre el electrodo y la disolución mejora extraordinariamente la selectividad de los electrodos debido a:

- 1) el carácter oxidativo o de reducción de la muestra puede modificar el potencial de oxidación del material del electrodo:
- 2) la actividad electrocatalítica del material del electrodo puede facilitar la oxidación/reducción de los componentes disueltos en la muestra;
- 3) el carácter ácido/básico de la muestra puede protonar/desprotonar el electrodo y,
- 4) la naturaleza y concentración de iones presentes en la muestra que difunden hacia el interior del material sensible mantienen la electroneutralidad.

En este trabajo se han utilizado dos materiales electrocatalíticos para modificar los sensores (apartado 2.1), nanopartículas de oro capadas con bromuro de tetraoctilamonio $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{Np}$ y una ftalocianina de cinc ZnPc1 . Además cabe recordar que uno de los objetivos era buscar un efecto sinérgico entre ambos cuando se combinan.

Trabajos previos llevados a cabo en este grupo han demostrado que electrodos voltamétricos químicamente modificados son materiales electrocatalíticos como

ftalocianinas y nanopartículas de oro pueden usarse para detectar diferentes compuestos en mostos y vinos [40, 79, 84].

Ya se ha comentado que AuNPs muestran propiedades electrocatalíticas únicas que dependen de su tamaño y de la naturaleza de los grupos protectores que la rodean. Además las nanopartículas también pueden influir sobre el comportamiento de las ftalocianinas [85]

El diseño de sistemas híbridos combinando diferentes materiales es muy atractivo para el desarrollo de sensores electroquímicos. Recientemente AuNPs y ftalocianinas se han combinado con resultados satisfactorios para obtener sensores electroquímicos que mejoran las propiedades electrocatalíticas [58, 85, 86, 87].

Los sensores desarrollados en el presente trabajo se han aplicado a la detección de catecol, un antioxidante, por tanto se hará una breve exposición de la importancia de este compuesto y de su comportamiento redox.

2.3. Importancia de los antioxidantes

Los antioxidantes se han convertido en un tema de creciente interés. Son compuestos que en baja concentración pueden prevenir el daño que causan reacciones oxidativas a través de radicales libres en las biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos poliinsaturados y azúcares), inhibiendo estas reacciones. Sus efectos beneficiosos para la salud están relacionados con enfermedades donde los procesos oxidativos tienen un papel fundamental como aterosclerosis, enfermedades coronarias, algunos tumores... [88-90]. Una dieta rica en fruta, verduras, cereales, y aceite de oliva puede prevenir algunas de estas enfermedades.

Los mayores compuestos antioxidantes de estos alimentos son los compuestos fenólicos. Estos compuestos son muy importantes en la industria alimentaria ya que además de contribuir a las propiedades antioxidantes contribuyen también con sus propiedades organolépticas. Su capacidad antioxidante está relacionada con su estructura molecular, más concretamente con la presencia y el número de grupos hidroxilo y los dobles enlaces conjugados [91].

Uno de los compuestos antioxidantes más activos es el catecol, que posee dos grupos hidroxilos en posición orto [92], (figuras 8 y 9).

A continuación se muestra el mecanismo de reacción a través de radicales libres en el que actúa como antioxidante (figura 8). El compuesto que tiene un radical libre es atrapado por un H del catecol cedido desde el grupo hidroxilo que pasa a convertirse en un radical. La segunda etapa es la reacción de este radical fenoxilo con otra molécula portando también un radical para dar la correspondiente neutralización [93].

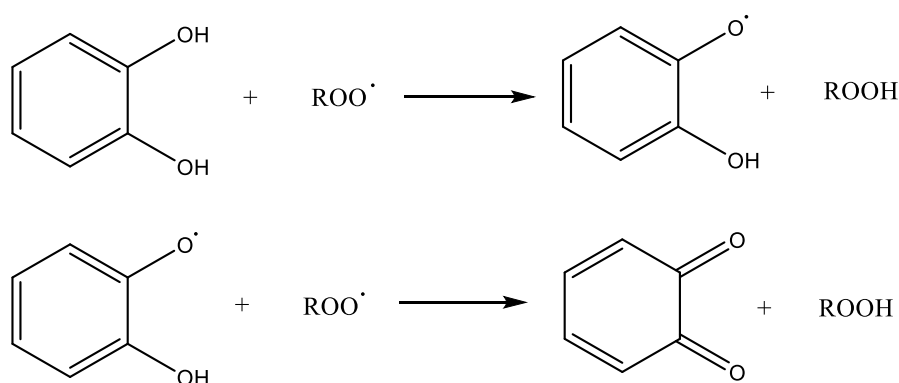


Fig 8. Mecanismo de reacción a través del cual el catecol actúa como antioxidante.

Pero la reacción que a nosotros nos interesa en este trabajo no es la radicalaria, sino un proceso redox clásico en el que el catecol se convierte en 1,2 benzoquinona de manera reversible (fig. 9)

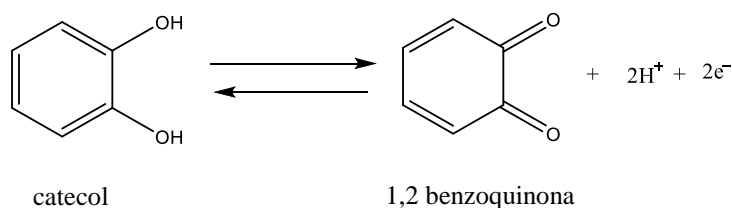


Fig 9. Reacción redox reversible del catecol y la 1,2 Benzoquinona

Debido a sus propiedades redox, los fenoles, y en concreto el catecol, pueden detectarse mediante técnicas electroquímicas. Como ya se ha comentado, estas técnicas son muy convenientes debido a su buena respuesta analítica con una instrumentación económica.

Existen varios ejemplos de sensores modificados con ftalocianinas o AuNP aplicados para la detección de antioxidantes [79, 87, 94, 95].

3. Materiales y métodos.

3.1 Reactivos

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado reactivo analítico, sin purificaciones adicionales y adquiridos en Sigma-Aldrich. Las soluciones se obtuvieron disolviendo las sustancias en agua desionizada (resistividad de $18,2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) obtenida a partir de un sistema de Mili-Q (Millipore, Direct-Q).

Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas en nuestro laboratorio por un método que se describe más adelante.

La ftalocianina utilizada 2-{2'-[(5''-Acetiltiopentiloxo)amino]etoxi}-9(10),16(17),23(24)-tri-tert-butilftalocianinato Zn(II) (en adelante ZnPc1,) fue suministrada por la profesora Ángela Sastre de la Universidad de Miguel Hernández de Elche, (fig. 10). [96]

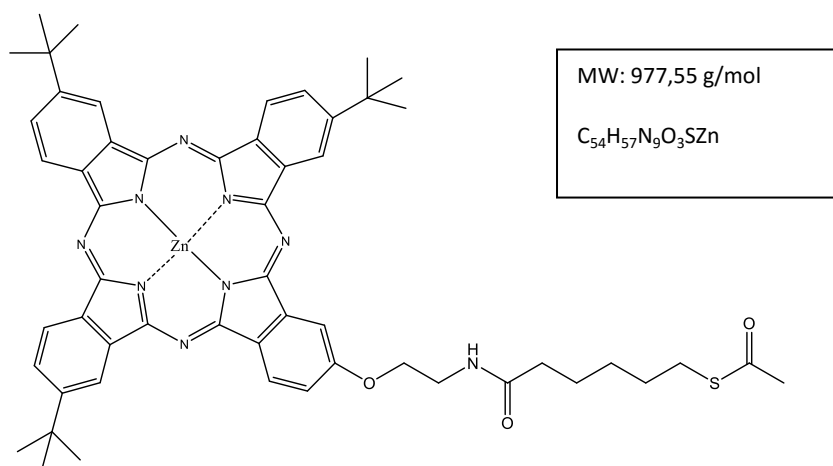


Fig 10. ZnPc1

3.2 Síntesis nanopartículas de oro funcionalizadas con bromuro de tetraoctilamonio.

El ácido tetracloroaurico se disuelve en agua milliQ (0,03M). Por otro lado se disuelve en tolueno el bromuro de tetraoctilamonio (0,13M). Se mezclan ambas soluciones en una proporción de 1 a 5,3 equivalentes respectivamente y se agitan a 1400 rpm durante 45 minutos. En este tiempo la fase acuosa pierde su color mientras que la fase orgánica se vuelve coloreada de un rojo-negro intenso.

Se añade borohidruro de sodio (0,027M) antes de separar ambas fases, gota a gota. Posteriormente se agita en atmósfera inerte de N₂ durante cinco horas hasta que se produce un cambio de color en la fase orgánica a un rojo cereza. Seguidamente se decanta la fase orgánica y se procede a un lavado por triplicado con agua milliQ.

El resultado es una disolución estable en tolueno de nanopartículas de oro funcionalizadas con bromuro de tetraoctilamonio (en adelante Au^{NBr}NP, fig 11)

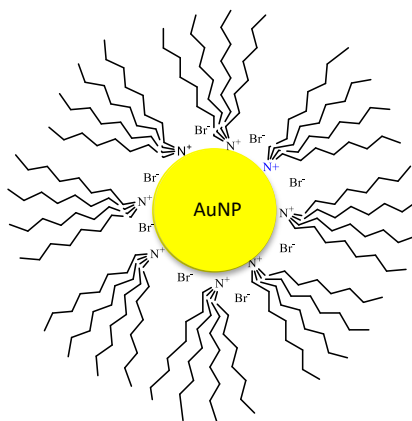


Fig11.Representación esquemática de Au^{NBr}NP.

3.3. Funcionalización de Au^{NBr}NP con ftalocianina de zinc ZnPc1.

Se ha trabajado con dos tipos de uniones:

- Mezcla las soluciones de Au^{NBr}NP y ZnPc1.
- Formación de un enlace covalente entre ambos compuestos a través de la unión del azufre de la ftalocianina con la nanopartícula de oro.

3.3.1 Mezcla de soluciones

La disolución obtenida de nanopartículas caracterizada con UV-vis ($Abs^{398nm} = 3,5 \text{ ua}$) se diluye diez veces y se mezcla con ZnPc1 ($6,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) ambas soluciones en tolueno. Se agita de manera suave manualmente, se protege de la luz y se espera una hora antes de comenzar las medidas. La proporción con la que se ha trabajado ha sido:



3.3.2. Unión covalente

Como se ha comentado anteriormente el objetivo de esta reacción es la obtención de un enlace covalente entre el oro de las nanopartículas y el azufre de la ftalocianina. Para ello:

Se mezclan las nanopartículas obtenidas anteriormente ($Abs^{398nm} = 3,5$ ua en tolueno, 4 ml) con ZnPc1 disuelta también en tolueno ($1,3 \times 10^{-3} M$, 4 mL). Se burbujea N_2 durante 5 minutos para eliminar el oxígeno de las disoluciones y se mantiene en atmósfera inerte durante 24h en agitación a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, se añade gota a gota sobre pentano (en tubos de centrífuga). Se deja reposar y se observa que se forma un precipitado verde con aspecto de copos de nieve. Se agita en el vortex (IKA Vortex, Genius 3) durante 10 minutos, y se centrifuga durante 15 minutos a 7000 rpm (ALRESA, Mod. Microcen).

Tras la centrifugación se forman dos precipitados distintos (uno sobre otro), uno de color claro casi blanco y otro más oscuro. Se separan y se trabaja únicamente con el precipitado oscuro. Este precipitado se disuelve en metanol, se enfría a $-20^{\circ}C$ durante toda la noche. Tras este tiempo se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Se observa que la aparición de un nuevo precipitado que finalmente se redissuelve en tolueno. Es aquí donde se encuentra nuestro producto deseado $Au^{NBr}NP-ZnPc1$ (fig 12).

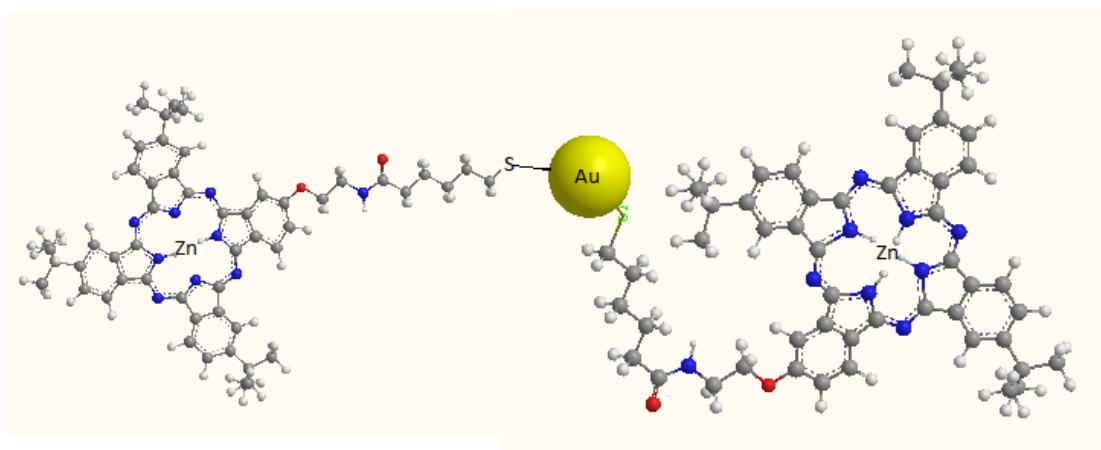


Fig 12. Producto de la reacción: $Au^{NBr}NP-ZnPc1$

3.4. Caracterización Estructural.

UV-Visible

Para la caracterización de los materiales electrocatalíticos se registraron espectros UV-vis en un espectrofotómetro de doble haz (Modelo UV-2600, adquirido en Shimadzu, fig.13)



Fig 13. Espectrofotómetro usado para la obtención de datos

Microscopía Electrónica de Trasmisión

Se usó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño de las NPs así como para comprobar la existencia de material orgánico a su alrededor.

Para la visualización, hay que preparar una suspensión diluida, se toma una sola gota de la suspensión y se deposita sobre una rejilla de cobre recubierta en una de sus caras de una película de carbono. La deposición se realiza sobre la película de carbono. Se deja secar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

El equipo utilizado para la obtención de estas imágenes es el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-FS2200 HRP, con emisión de Campo de 200kV.

3.5. Fabricación de sensores voltamétricos. Spin Coating

Para la preparación de los sensores voltamétricos se utilizó como sustrato vidrio cubierto con óxido de indio y estaño (ITO) (figura 14a)

Sobre el ITO se depositaron las capas de los distintos materiales utilizando la técnica de spin coating (MIKASA, spincoater 1H-D7, fig 15a y fig 15b) bajo las siguientes condiciones:

- Deposición de 50 μL de muestra.
- Rampa de 120 segundos
- Mantenimiento otros 120 s a 1000rpm

Una vez depositada la muestra, se aplicó una línea de laca de plata en el extremo para facilitar el paso de corriente al electrodo (figura 14b)



Fig 14. 14a sensor sin modificar, 14b sensor con laca de plata.

Se prepararon 4 sensores diferentes:

- Sensor modificado con sólo $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$
- Sensor modificado con sólo ZnPc1 .
- Sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP} + \text{ZnPc1} \rightarrow 2:1$
- Sensor modificado con la unión covalente $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP} - \text{ZnPc1}$

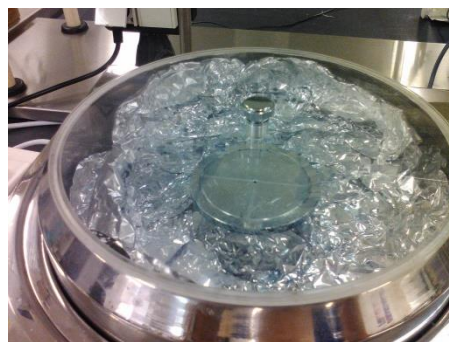


Fig. 15. a) (imagen izquierda), fotografía del spincoater usado para la deposición de la película. b) (imagen derecha), rotor del spincoater visto desde arriba.

3.6. Obtención de datos electroquímicos

Las medidas electroquímicas fueron llevadas a cabo en un potenciostado (PGSTAT 128N, Autolab), (fig. 16a), llevando a cabo voltametría cíclica. Para ello, se utilizó una celda convencional de tres electrodos (Fig.16b). Los sensores preparados se utilizaron como electrodo de trabajo, el electrodo de referencia fue Ag|AgCl/KCl 3M y como contraelectrodo se utilizó una lámina de platino (figura 16c). Los voltamogramas cíclicos se registraron a una velocidad de barrido de 0,1 V/s (excepto para los estudios cinéticos que consiste en variar dicha velocidad como se explicará más adelante), con 10 ciclos para asegurar la estabilización del sensor, con 1cm² de superficie del electrodo sumergida en la disolución.

En primer lugar se llevó a cabo la voltametría cíclica del sustrato sin modificar, tanto en buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,01M) que es considerado nuestra línea base, como en presencia de nuestro analito (catecol) a diferentes concentraciones, con interés de conocer el comportamiento previo de nuestro sustrato y la respuesta frente a catecol.

Después se midieron cada uno de los sensores preparados, en las mismas condiciones que el ITO.

Todas las medidas se registraron a temperatura ambiente.

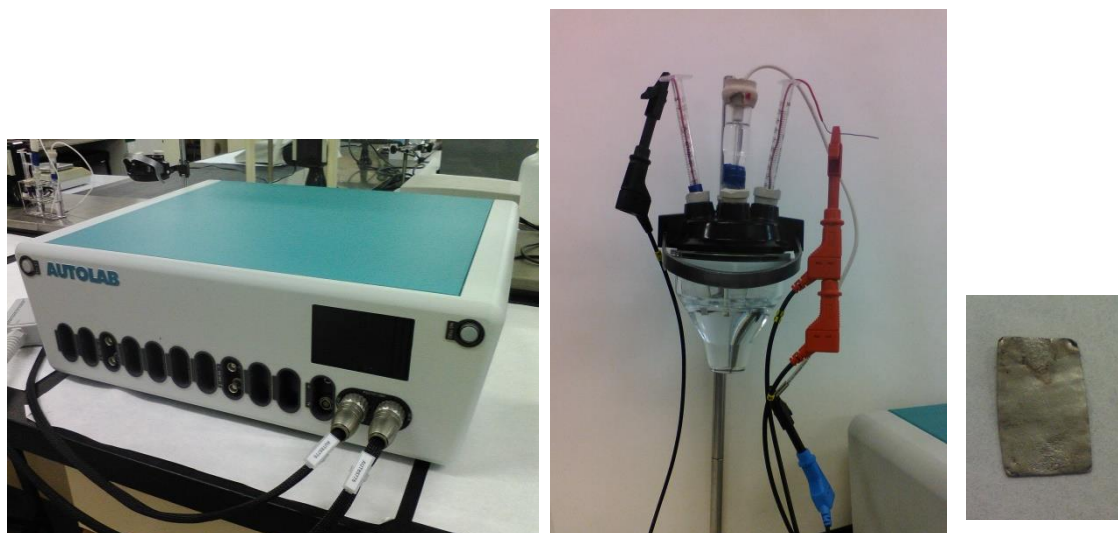


Figura 16 a (izquierda), Imagen del potenciostato utilizado. b) (derecha), imagen del montaje de la celda usada para la medición. c) placa de platino

3.6.1. Cálculo de los límites de detección

Con el objetivo de conocer la concentración mínima de catecol que nuestros sensores son capaces de detectar se calcularon los límites de detección.

Para ello se realizó una primera medida de la respuesta al analito en buffer fosfato y se añadieron progresivamente volúmenes conocidos de una disolución de catecol de concentración también conocida, con el fin de ir aumentando la concentración. Debe observarse que a medida que aumenta la concentración de catecol, la intensidad de los picos anódicos y catódicos también debe aumentar.

Finalmente se hizo una representación gráfica de la intensidad de corriente a la que se registraron los picos de oxidación o reducción del catecol frente a su concentración, y con ayuda de la fórmula (1) se calculó la concentración mínima que sería capaz de detectar.

$$LD = \frac{3SD}{m} \quad (3)$$

Donde SD es la desviación estándar y m la pendiente de la recta obtenida.

Para el estudio de los límites de detección del sensor se trabajó en un rango de concentraciones de 4×10^{-6} M a 1.8×10^{-4} M de disolución de catecol en buffer fosfato.

3.6.2 Cálculo de transporte de los electrones.

Cuando se barre el potencial del electrodo a bajas velocidades, respecto de la velocidad estándar de transferencia electrónica asociada a un par redox de interés, la reacción redox puede considerarse reversible, es decir que ocurre a través de estados de equilibrio. En este caso, los picos anódico y catódico son imágenes especulares el uno del otro y se hallan centrados en el potencial formal, $E^{\circ'}$.

A medida que se aumenta la velocidad de barrido, la reacción se vuelve irreversible y los picos se alejan del $E^{\circ'}$ en direcciones opuestas. Es decir, el pico anódico se mueve hacia potenciales más positivos y el pico catódico, lo hace hacia potenciales más negativos. El grado de separación de los picos depende de la cinética propia del par.

Materiales y métodos

El marco teórico para el análisis de la electroquímica de este tipo de sistemas fue desarrollado por Laviron en la década de 1970 [97, 98]

Experimentalmente, esto se realiza con un conjunto de voltametrías cíclicas medidas a velocidades de barrido crecientes y, a partir de las mismas, se representa gráficamente la intensidad y posición de los picos anódico y catódico en función de la velocidad de barrido.

Por lo tanto, se representaron dos tipos de gráficas:

- Ecuación de **Laviron**: La intensidad de corriente del pico redox frente a la velocidad de barrido → si se ajusta a una línea recta la etapa limitante es la transferencia de electrones del analito al electrodo.
- Ecuación de **Randles-Sevcik**: donde se representa intensidad de corriente del pico redox frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido → si se ajusta a una línea recta la etapa limitante es la difusión de los iones del analito hasta la superficie del electrodo (siendo un proceso Nerstiano).

El mecanismo predominante es aquel cuyos datos se ajusten mejor a una recta, para ayudarnos en esta decisión utilizamos el coeficiente de regresión lineal R^2 .

En nuestro caso, para el estudio cinético se trabajó en un rango de velocidades de barrido de 10 mV/s a 1000 mV/s en 50 mL de catecol 10^{-4} M.

4. Resultados

En esta sección se mostrarán los datos obtenidos del resultado de la caracterización de los materiales utilizados y el estudio de las propiedades electrocatalíticas de los sensores preparados.

Primero se realizó la síntesis de nanopartículas $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (ver apartado 3.2) y su caracterización y la caracterización de la ZnPc1 . Posteriormente se procedió a la combinación de estos dos materiales de dos maneras distintas (según se ha comentado en el apartado 3.3)

Estas sustancias nunca han sido utilizadas como materiales electrocatalíticos y es ese el objetivo de este trabajo. Evaluar el efecto electrocatalítico de los materiales solos y de su combinación en búsqueda de un posible efecto sinérgico. Para ello se depositaron sobre el sustrato de ITO mediante spincoating (más detallado en el apartado 3.6). Estos sensores se caracterizaron electroquímicamente con voltametría cíclica.

Finalmente se presentará una tabla resumen con objeto de facilitar la discusión de dichos datos y la obtención de conclusiones.

4.1. Caracterización estructural de los materiales empleados: $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$, ZnPc1 , $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ y $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$.

Antes de preparar sensores con estos materiales, se hace necesaria una caracterización estructural previa. Para ello se realizó una medida de absorción UV-vis y microscopía TEM.

El primer material que se caracterizó fueron las nanopartículas. Su síntesis fue llevada a cabo en el laboratorio a partir de ácido tetracloroaurico y bromuro de tetraoctilamonio, con una posterior reducción con borohidruro sódico, obteniendo por tanto nanopartículas de oro capadas con bromuro de tetraoctilamonio $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ en tolueno.

En el espectro de absorción UV-vis (fig. 17) se observa una banda de plasmón con máxima intensidad a 398 nm, así como un pequeño hombro en torno a 485 nm. La

banda es bastante estrecha lo que indica que las nanopartículas presentan una dispersión de tamaños pequeña.

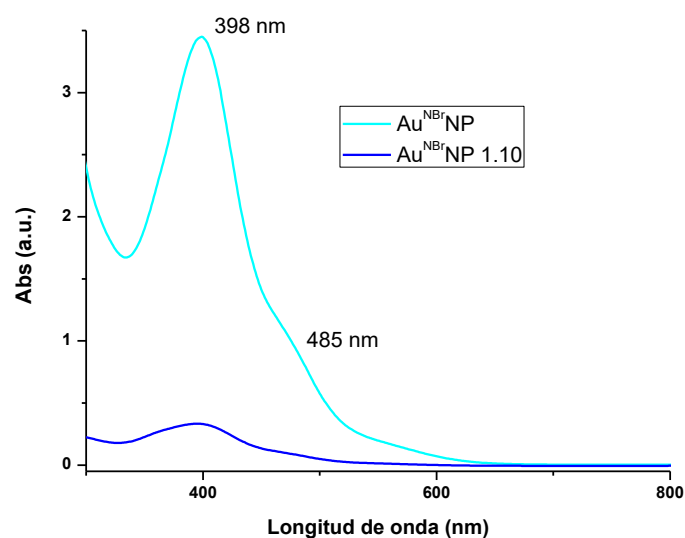


Fig. 17. Espectro de absorción UV-vis de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$. En azul claro la disolución obtenida tras la síntesis, y en azul oscuro la disolución diluida usada para modificar el sensor, diluida en tolueno 1:10 respecto de la primera.

Para corroborar esta afirmación así como para el estimar el diámetro de estas nanopartículas de oro capadas con bromuro de tetraoctilamonio se tomaron imagen de microscopía TEM (fig. 18). Se confirmó que $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ mostraban un tamaño muy homogéneo con un diámetro de 2-3 nm.

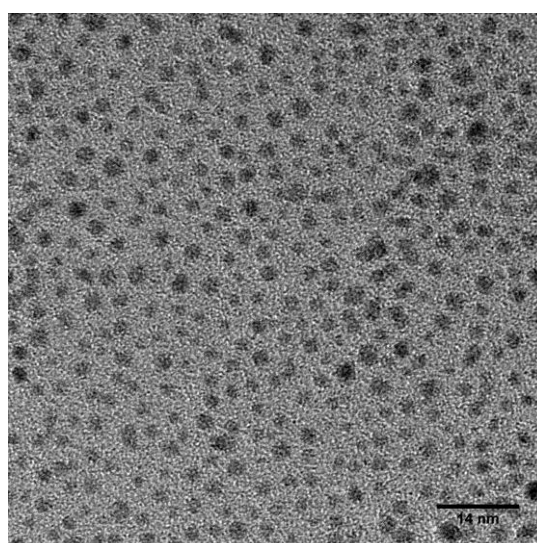


Fig. 18. Imagen TEM de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$

Resultados

El siguiente material en ser caracterizado fue ZnP1. En este caso, por tratarse de un compuesto orgánico no se realizaron las medidas en el microscopio TEM. En el espectro de absorción UV-Vis (fig. 19) se ven los tres picos característicos de una ftalocianina, en este caso a 676, 612 y 354 nm correspondientes a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos aromáticos.

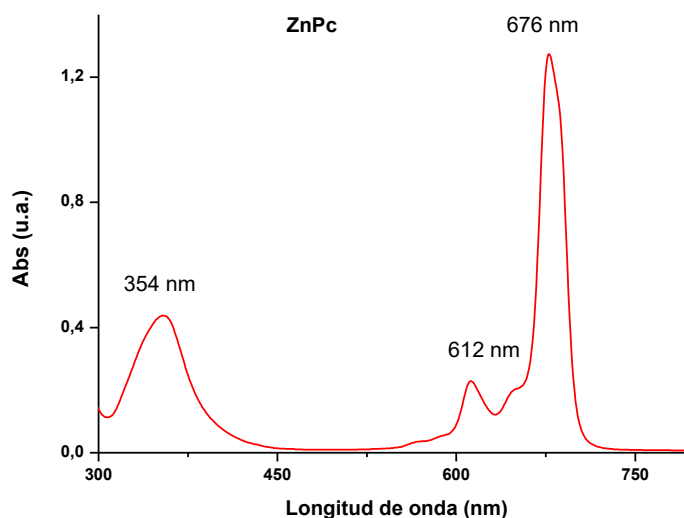


Fig 19. Espectro de absorción UV-Vis de ZnPc1 $6,5 \times 10^{-5}$ M en tolueno.

Una vez conocidos los materiales electrocatalíticos por separado, se pasó a caracterizar las diferentes combinaciones de ambos con los que se ha trabajado en la presente memoria.

En primer lugar a mezcla $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP} + \text{ZnPc1}$ que como se recordará se preparó a partir de la disolución diluida de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (línea azul oscuro en la figura 17) y la disolución de ZnPc1 caracterizada anteriormente, en proporción 2:1. (apartado 3.3.1.)

En el espectro de absorción UV-vis de esta mezcla (fig. 20), puede verse como la banda Q (a 676 nm) es mucho más simétrica que en el caso de la ZnPc 1 sola. Además la banda B ha aumentado su intensidad con respecto a la banda Q, y aparece solapada con la banda de plasmón de la nanopartícula que aparece desplazada ligeramente hacia longitudes de onda menores.

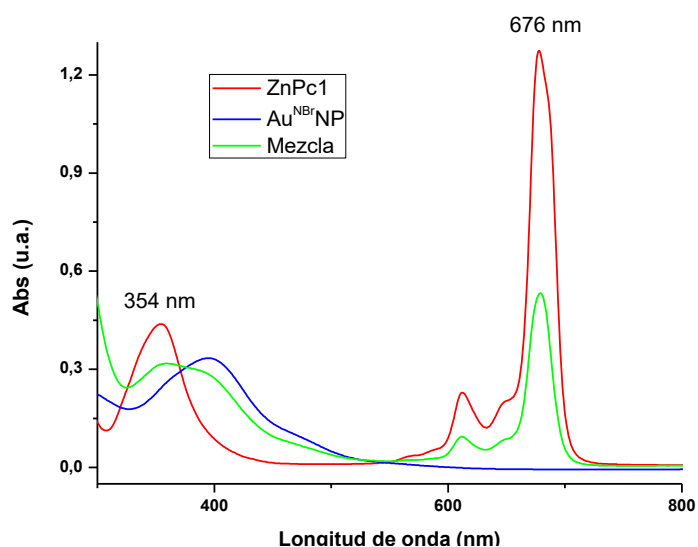


Fig 20. Espectro de absorción UV-vis . En rojo ZnPc1 $6,5 \times 10^{-5} \text{M}$ en tolueno, en azul Au^{NBr}NP en tolueno , y en verde la mezcla de ambos materiales en proporción 1 de ZnPc y 2 de Au^{NBr}NP.

En la imagen de microscopía electrónica de transmisión (fig. 21) se aprecia la estructura cristalina del oro. Ahora existe una mayor dispersión de tamaño de las nanopartículas con respecto a las nanopartículas iniciales. Se ha estimado un diámetro de entre 2-5 nm (frente a las 2-3 nm de antes) donde el diámetro aproximado predominante es 4nm. Además se observa un halo más claro entorno a la nanopartícula, lo que indica que se encuentran rodeadas de material orgánico, en este caso presumiblemente ZnPc1.

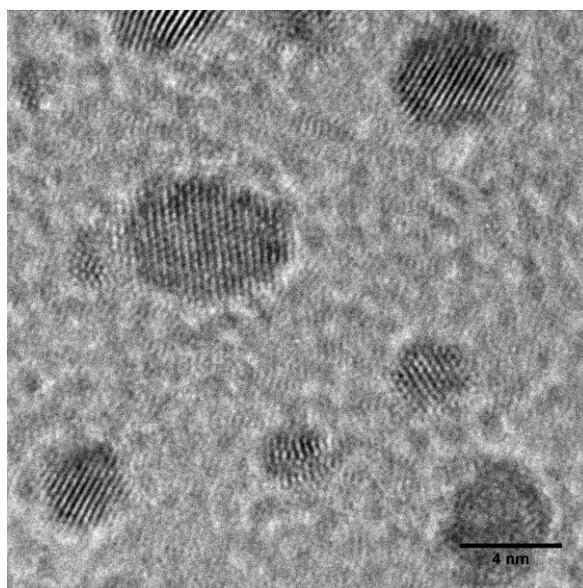


Fig. 24. Imagen de microscopía TEM de la mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1 en proporción 2.1

Resultados

Por último se realizó la caracterización estructural del producto de la reacción llevada a cabo entre $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ y ZnPc1 con el objeto de formar un enlace covalente entre ambos a través del átomo de azufre de la ftalocianina ($\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$). Aunque el procedimiento está detallado en el apartado 3.3.2 se hará un breve recordatorio de cómo se llevó a cabo.

Se mezclaron las disoluciones de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ y ZnPc1 ambas en tolueno, y se mantuvieron en agitación bajo condiciones inertes durante 24 h. Posteriormente se añadieron sobre pentano para facilitar su precipitación y proceder a varias etapas de lavado con pentano y metanol y finalmente su resuspensión en tolueno.

En el espectro UV-Vis (fig. 25) de esta sustancia se ve un pico a 391 nm que podría ser un desplazamiento de la banda de la nanopartícula debido a la unión al azufre, además aparece un hombro a 330 nm. Se mantienen los picos de ZnPc1 a 676 nm y 612 nm sin sufrir desplazamiento, aunque el pico a 676 nm si se ve nuevamente más simétrico.

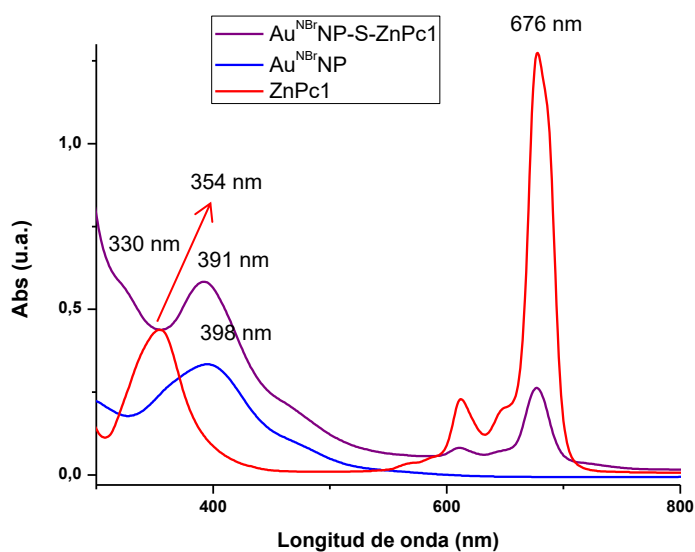


Fig. 25. Espectro de absorción UV-vis de ZnPc1 (en rojo), $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (en azul) y $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$ (en morado)

La imagen obtenida del microscopio TEM (fig 32) muestra que existe de nuevo mayor dispersión de tamaño con respecto a la nanopartícula sola, además éstas han incrementado su tamaño hasta un diámetro medio de 6-8 nm y aparecen rodeadas de una capa orgánica atribuible a la ftalocianina.

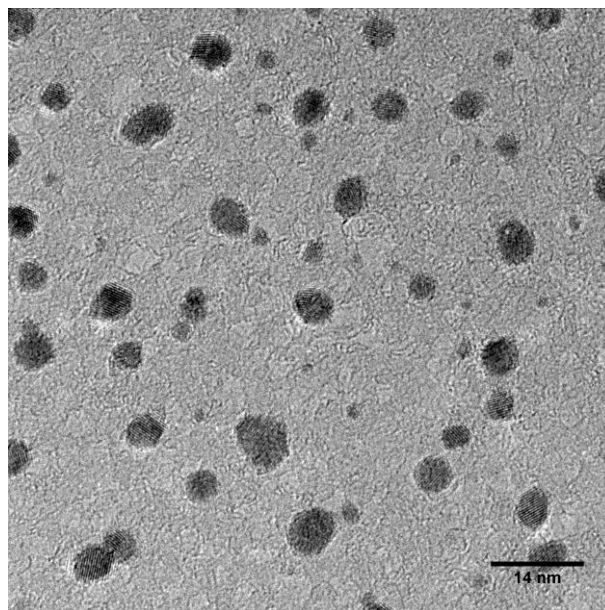


Fig. 32. Imagen de microcopía TEM de Au^{NBr}NP-S-ZnPc1

Una vez conocidos estructuralmente los materiales empleados se pasará a conocer su comportamiento electroquímico.

4.2. Respuesta electroquímica del electrodo sin modificar.

Antes de poder evaluar el comportamiento electroquímico de los materiales desarrollados es necesario conocer cómo se comporta un sensor de ITO (nuestro sustrato) que no ha sido sometido a modificación.

En primer lugar se comprueba su comportamiento en buffer fosfato 0,01M, obteniendo una respuesta prácticamente lineal.

Cuando el electrodo se introduce en una disolución de catecol 10^{-3} M, (fig 33a y 33b) cabría esperar observar un par redox reversible asociado a la oxidación del catecol a su forma quinoide. Sin embargo sólo se observa la onda catódica y el inicio de la onda anódica, ya que este proceso ocurre a potenciales mayores que nuestro rango de trabajo.

A medida que aumenta la concentración de catecol, la intensidad de las ondas anódicas y catódicas también aumenta, tal y como cabría esperar (fig 33c).

Resultados

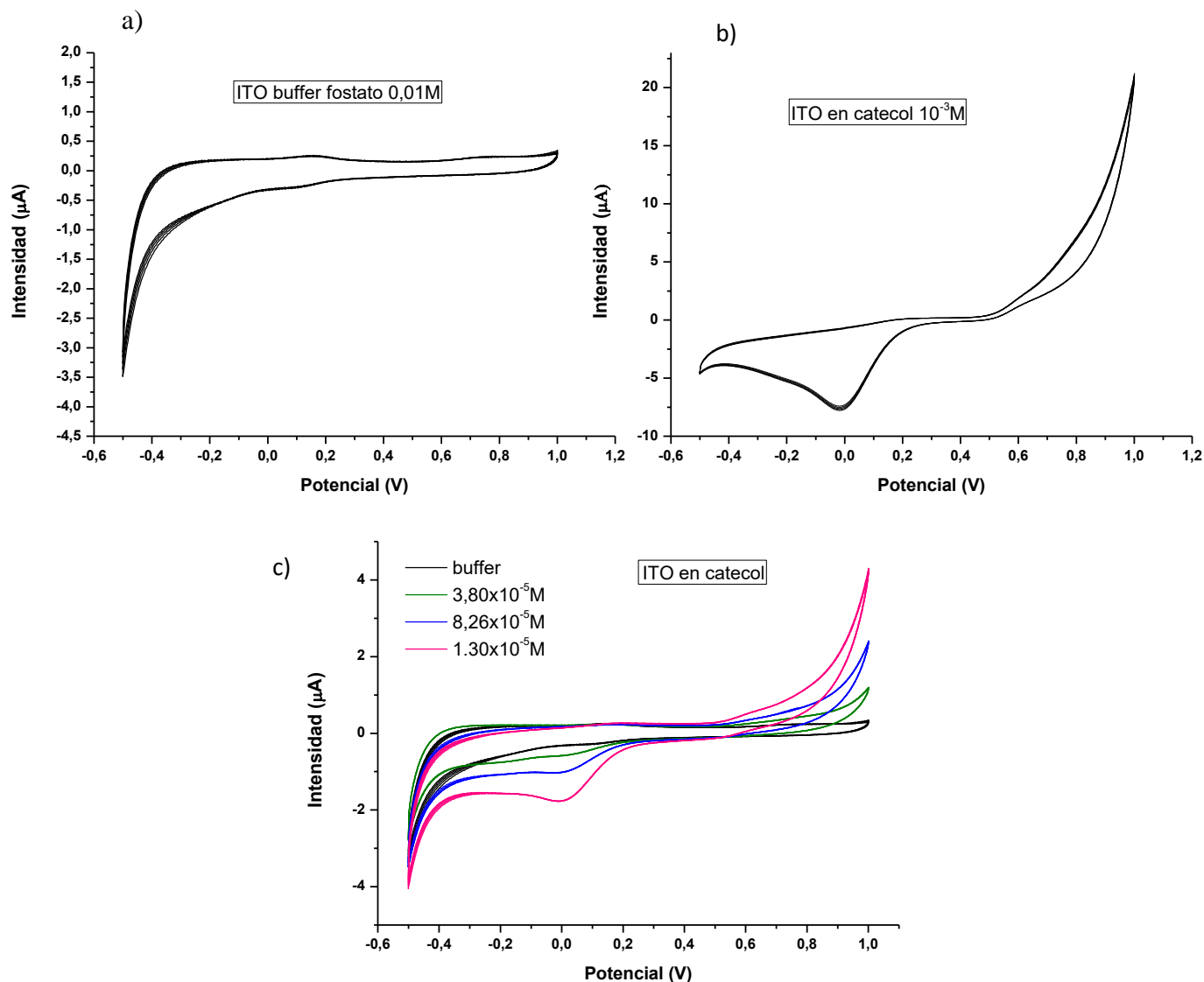


Fig 33. Voltametría cíclica de un sensor de ITO sin modificar **a)** frente a buffer fosfato 0,01M. **b)** en catecol 10^{-3}M **c)** frente a diferentes concentraciones de catecol

Seguidamente se procede con la cinética (procedimiento explicado en el apartado 3.6.2. de materiales y métodos) para poder conocer el mecanismo de transferencia de electrones.

La oxidación tiene lugar a 634 mV mientras que la reducción ocurre a 2 mV. A la vista de las gráficas (fig.34) se puede comprobar que, tanto para la oxidación como para la reducción, los datos que mejor se ajustan a una recta son la intensidad frente a la velocidad, cumpliendo la ecuación de Laviron ($R^2 = 0,9959$ para la oxidación y $R^2 =$

0,9993 para la reducción), siendo por tanto la transferencia de electrones desde el analito (catecol) al electrodo la etapa limitante en ambos procesos.

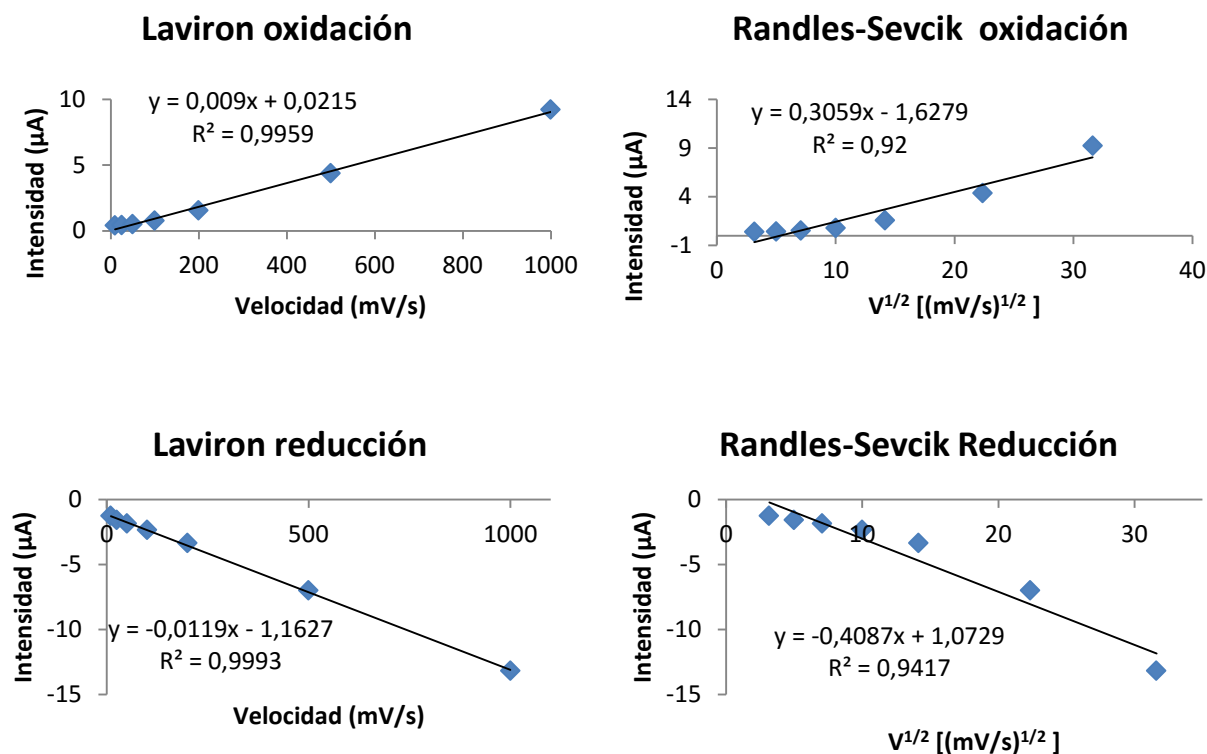


Fig 34. a) Intensidad de la onda anódica a 634 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor sin modificar en catecol 10^{-4}M **b)** Intensidad de la onda catódica a 2 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor sin modificar en catecol 10^{-4}M .

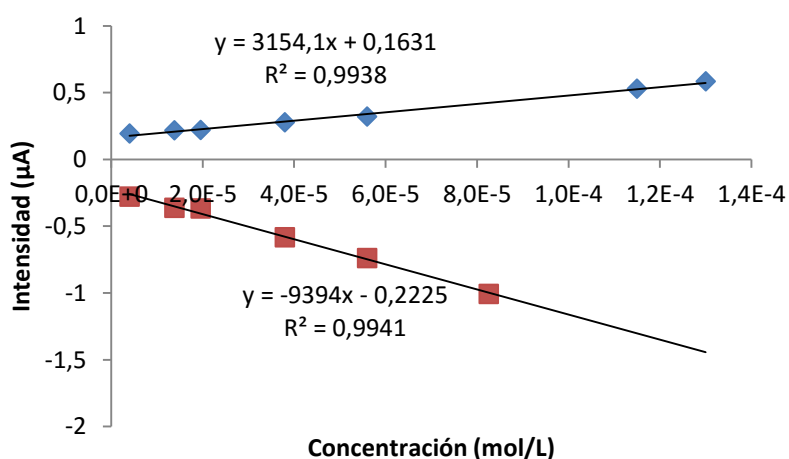


Fig 35. Recta de calibrado a partir de la onda anódica a 634 mV (datos en azul) y de la onda catódica a 2 mV (datos en rojo) de la intensidad frente a diferentes concentraciones crecientes de catecol para el sensor sin modificar

Confirmado que la asignación de los picos redox es correcta y corresponde a los procesos redox del catecol se procede al cálculo de los límites de detección del sensor sin modificar para este analito con ayuda de la figura 35 (procedimiento detallado en el apartado 3.7.1) Encontrando que el límite de detección para la oxidación es $3,84 \times 10^{-6} \text{M}$ ($R^2 = 0,9938$) y de $3,13 \times 10^{-6} \text{M}$ para la reducción ($R^2 = 0,9941$).

4.3. Respuesta electroquímica del sensor modificado con Au^{NBr}NP

Una vez conocido el comportamiento electroquímico del ITO se pasó a modificar el sensor con las nanopartículas Au^{NBr}NP mediante la técnica de spin-coating (Condiciones: 50 μL , 120s de rampa y otros 120s a 1000 rpm).

Cabe recordar que la disolución usada para modificar el sensor mostraba un máximo de absorbancia en UV-Vis a 398 nm con una intensidad de 0,33 u.a.

Para su caracterización electroquímica se realiza voltametría cíclica. En buffer fosfato 0,01M, puede apreciarse ya el efecto electrocatalítico de Au^{NBr}NP acelerando la descomposición del agua del medio (que tiene lugar a potenciales negativos) (fig. 36).

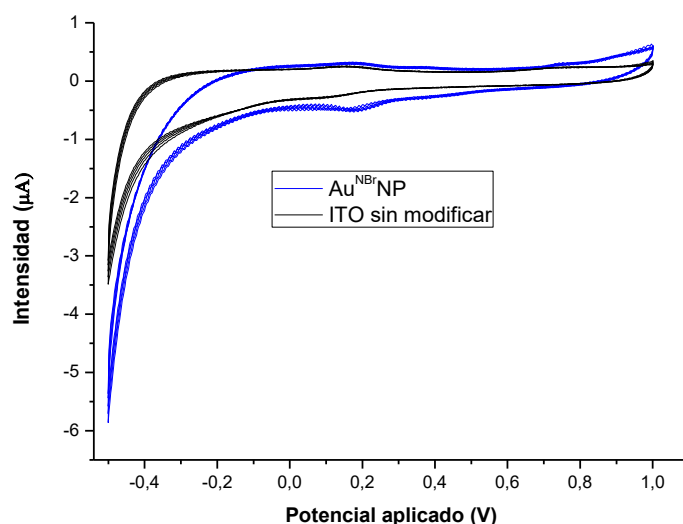


Fig 36. Voltametría cíclica frente a buffer fosfato 0,01M de un sensor de ITO modificado con Au^{NBr}NP.

Además aparece un pico de oxidación a 0,19V (fig. 36) correspondiente a la oxidación del Au^0 al Au^{1+} y un hombro de oxidación a 0,75 V correspondiente a la oxidación del Au^{1+} al Au^{3+} , en cuanto a la reducción, aparece un pico a 0.2 V correspondiente a la reducción del Au^{3+} al Au^0 .

En catecol 10^{-3}M se aprecia mucho mejor el efecto electrocatalítico de $\text{Au}^{\text{NBri}}\text{NP}$ doblando la intensidad con la que se detectan los picos (fig. 37a). Se comprueba de nuevo que efectivamente a medida que aumenta la concentración de catecol, aumenta la intensidad de los picos (fig. 37b).

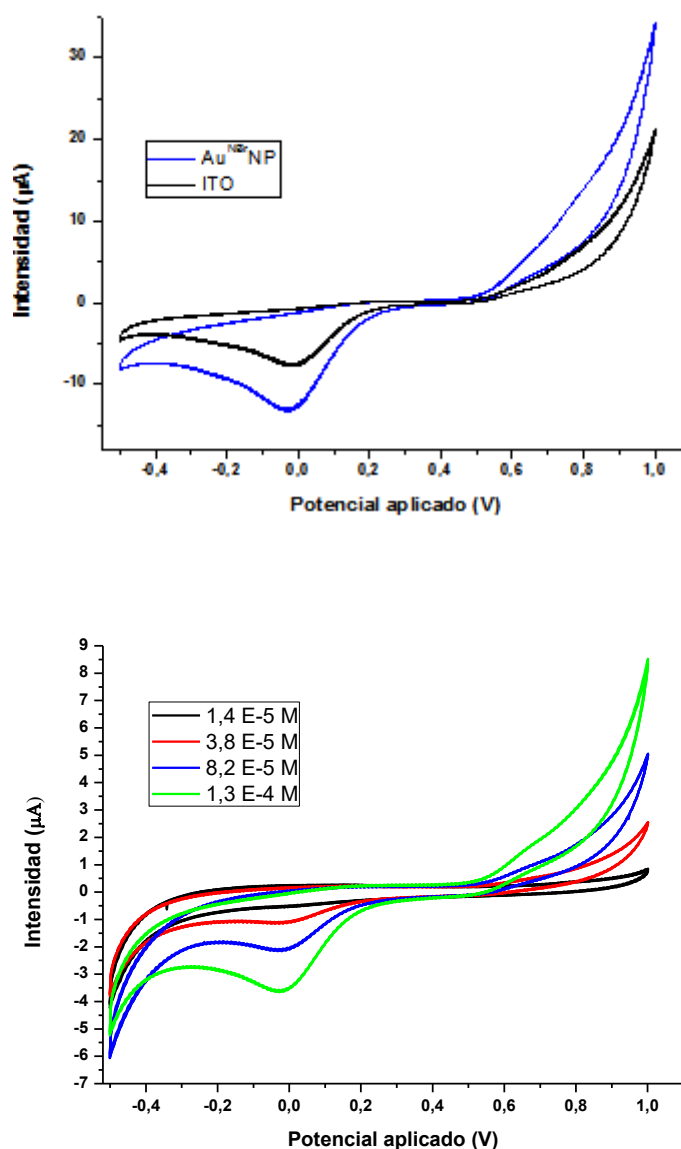


Fig. 37. a) Voltametría cíclica en medio catecol 10^{-3}M , en negro de un sensor ITO sin modificar, en azul del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBri}}\text{NP}$. **b)** Voltametría cíclica del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBri}}\text{NP}$ en diferentes concentraciones de catecol desde $1,4 \times 10^{-5}\text{M}$ a $1,3 \times 10^{-4}\text{M}$.

Resultados

El último paso para la caracterización de este sensor es determinar qué mecanismo sigue la transferencia de electrones. Para ello se realizó la voltametría cíclica en catecol 10^{-4}M en un rango de velocidades de barrido desde 10 mV/s hasta 1000 mV/s (fig. 38). Se observa como a medida que aumenta la velocidad, los ciclos son más abiertos y el potencial de los picos se va desplazando a potenciales más negativos.

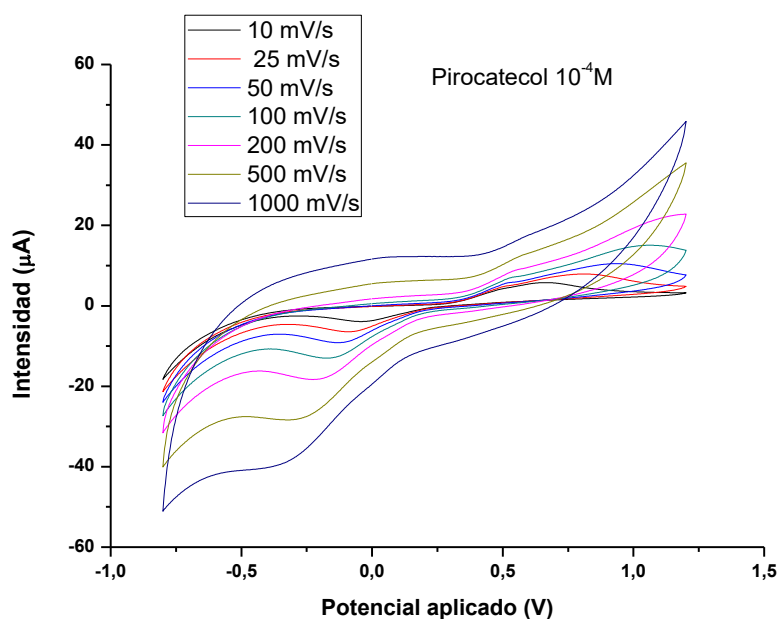


Fig 38. Voltametría cíclica del sensor modificado con Au^{NBr} NP en catecol 10^{-4}M a velocidades de barrido desde 10mV/s hasta 1000 mV/s .

Representando estos datos gráficamente a través de las ecuaciones descritas por Laviron y Randles-Sevcik, los datos se ajustan a la ecuación de Randles-Sevcik (la intensidad a la que ocurren el proceso redox es función lineal de $v^{1/2}$) tanto para la oxidación que se produce a 673mV ($R^2 = 0,9987$) como para la reducción a la -26 mV ($R^2 = 0,9989$). Por tanto la etapa limitante del proceso es la difusión de los iones del analito hasta la superficie del electrodo, (fig.39).

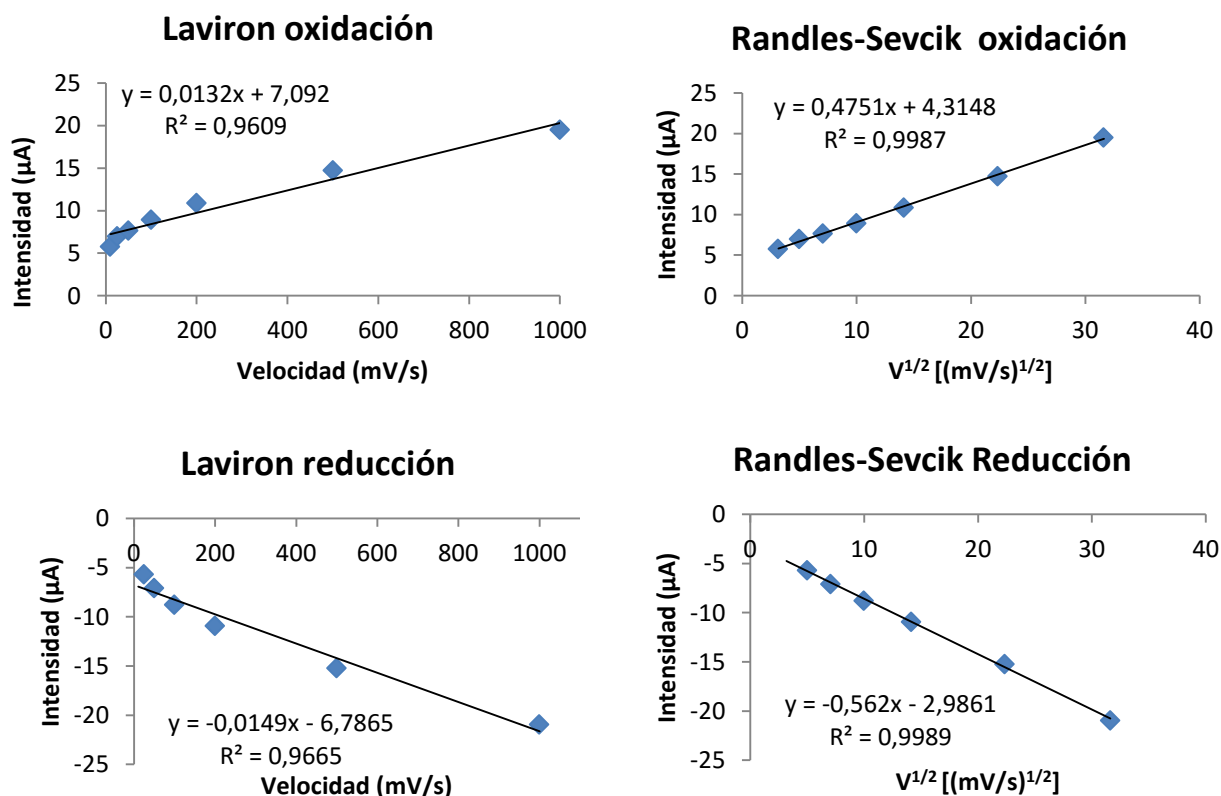


Fig 39. (Arriba) Intensidad de la onda anódica a 673 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ en catecol 10^{-4}M para el sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (abajo) Intensidad de la onda catódica a -26 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ en catecol 10^{-4}M para el sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$.

Conocido el comportamiento electroquímico del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$, el último paso es el cálculo del límite de detección de catecol según el procedimiento descrito anteriormente, ayudándonos del gráfico que se muestra a continuación (fig. 40)

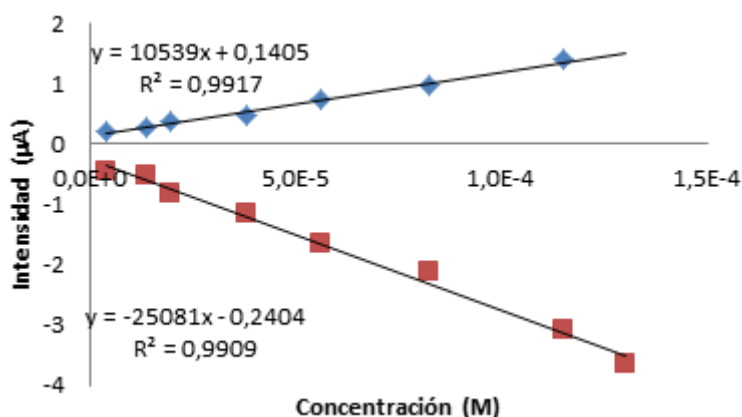


Fig 40. Recta de calibrado a partir de la onda anódica a 673 mV (datos en azul) y de la onda catódica a -24 mV (datos en rojo) de la intensidad frente a diferentes concentraciones crecientes de catecol para el sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$.

Resultados

La oxidación tiene lugar a 673 mV, y tiene un límite de detección de $4,4 \times 10^{-6} \text{M}$ ($R^2 = 0,9987$), mientras que la reducción ocurre a un potencial de -26 mV con un límite de detección de $2,8 \times 10^{-6} \text{M}$ ($R^2 = 0,9989$).

4.4. Respuesta electroquímica del sensor modificado con ZnPc1

El siguiente material caracterizado electroquímicamente es ZnPc1. Para ello se modificó el sensor de ITO mediante spin-coating en las condiciones ya descritas con la disolución de ZnPc1 mostrada anteriormente.

Su voltametría cíclica en catecol 10^{-3}M muestra como en comparación con $\text{Au}^{\text{NBr}} \text{NP}$ la intensidad de los picos es mucho mayor, especialmente en la reducción, por tanto cabría esperar un mayor efecto electrocatalítico que la nanopartícula (fig. 41)

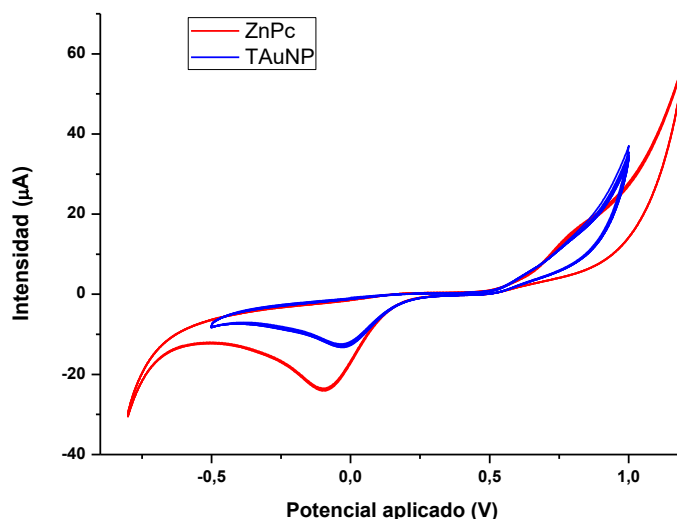


Fig. 41. Voltametría cíclica en catecol 10^{-3}M , en rojo correspondiente al sensor modificado con ZnPc 1 y en azul correspondiente al sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}} \text{NP}$.

La oxidación tiene lugar a un potencial de 783 mV, mientras que la reducción tiene lugar a -104 mV, comparados con los potenciales a los que el proceso redox ocurría para el sensor modificado con la nanopartícula ocurren a potenciales más distanciados entre sí, lo que indica que $\text{Au}^{\text{NBr}} \text{NP}$ sería mejor material electrocatalítico que ZnPc1.

En la voltimetría cíclica de este sensor, realizada en catecol 10^{-4}M a distintas velocidades de barrido desde 25 mV/s a 1000 mV/s (fig. 42) se observa nuevamente como al aumentar la velocidad los ciclos se abren y se desplazan a potenciales más negativos, aunque en el caso del sensor con modificado con ZnPc1 el desplazamiento hacia potenciales más negativos en menos pronunciado que en el caso del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$.

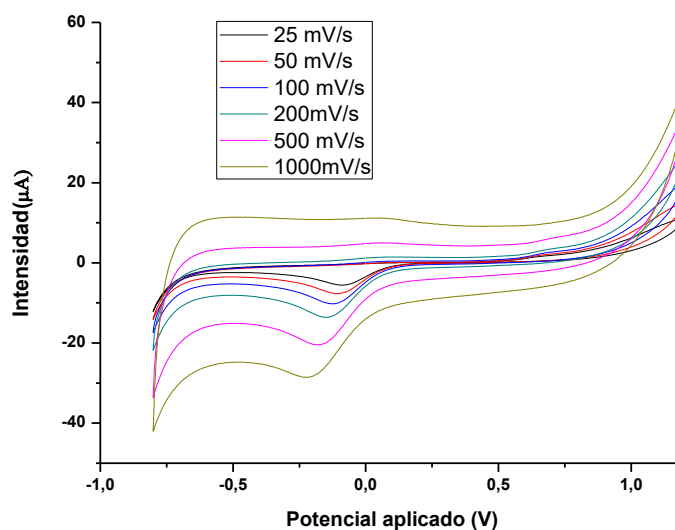


Fig 42. Voltametría cíclica en catecol 10^{-4}M para el sensor modificado con ZnPc1, a distintas velocidades de barrido desde 25 mV/s a 1000 mV/s

Con ayuda de estos datos podemos calcular cual será la etapa limitante en el mecanismo de transporte de electrones. La oxidación se ajusta más a un mecanismo limitante por la transferencia de electrones desde anilito al electrodo (Laviron $R^2 = 0,9957$), mientras que en la reducción se ajusta mejor a un mecanismo en el que la etapa limitante es la difusión del analito hasta el electrodo (Randles-sevcik $R^2 = 0,9952$) (fig. 43)

Y por último como parte del objetivo se calcula también sus límites de detección para catecol siendo $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$ para la oxidación (a 783 mV , $R^2 = 0,9932$) y $5,4 \times 10^{-6}\text{ M}$ para la reducción (a -104 mV , $R^2 = 0,9957$) (fig. 44).

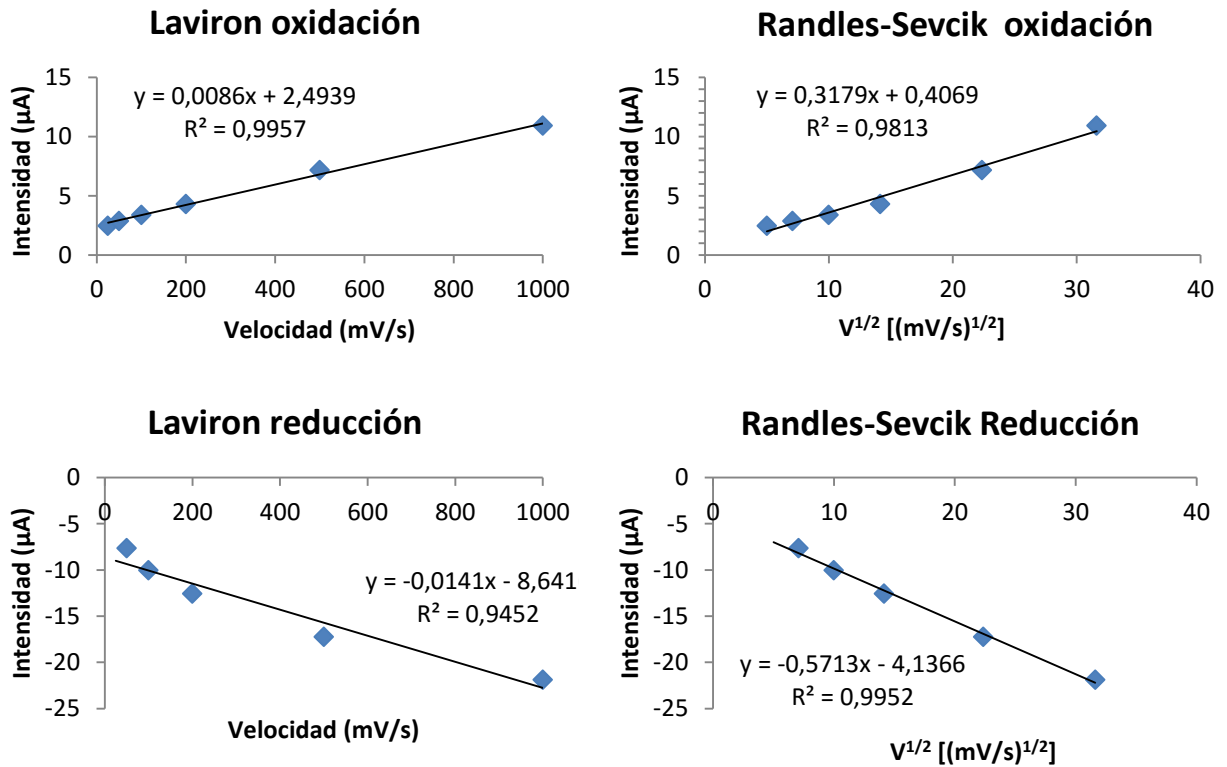


Fig 43. Arriba) Intensidad en catecol $10^{-4}M$ de la onda anódica a 783 mV frente a la velocidad de barrido (desde 25 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con ZnPc1. **(Abajo)** Intensidad de la onda catódica en catecol $10^{-4}M$ a -104 mV frente a la velocidad de barrido (desde 25 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con ZnPc1.

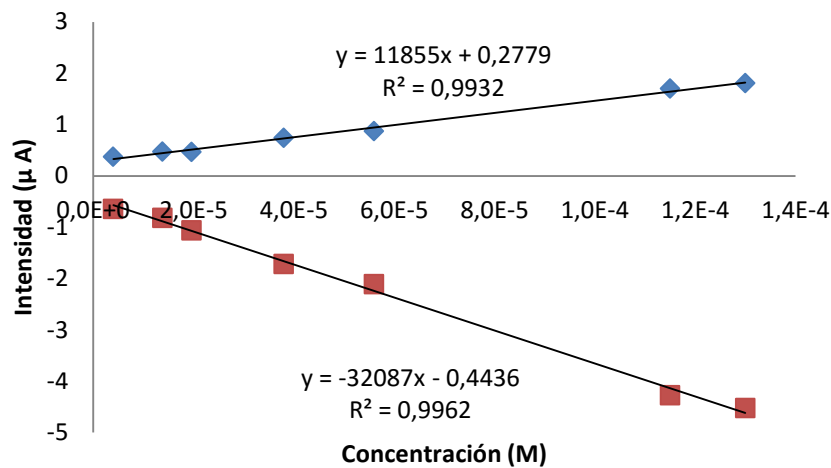


Fig. 44. Recta de calibrado a partir de la onda anódica a 783 mV (datos en azul) y de la onda catódica a -104 mV (datos en rojo) de la intensidad de estas ondas frente a diferentes concentraciones crecientes de catecol para el sensor modificado con ZnPc1.

4.5. Respuesta electroquímica del sensor modificado con mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1

Una vez conocido el comportamiento electroquímico que presentan los materiales Au^{NBr}NP y ZnPc1 por separado se procedió a caracterizar electroquímicamente la mezcla de ambos depositada en el sensor de ITO mediante spin-coating. Cabe recordar que esta mezcla se realizó con las disoluciones expuestas anteriormente en proporción 2 de Au^{NBr}NP a 1 de ZnPc1

La voltametría cíclica en catecol 10^{-3} M del sensor modificado con la mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1 muestra claramente una mayor intensidad de las ondas anódica y catódica respecto el sensor sin modificar (fig. 45).

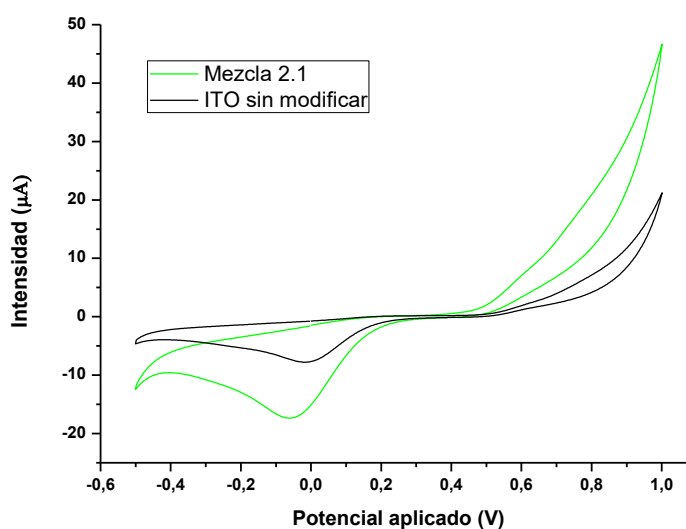


Fig. 45. Voltametría cíclica en catecol 10^{-3} M del sensor sin modificar (en negro) y del sensor modificado con la mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1 (en verde)

Cuando se compara su voltamograma con el de Au^{NBr}NP y ZnPc1 por separado, los potenciales a los que ocurre la oxidación (632 mV) y la reducción (24 mV) son menores y se encuentran más próximos entre sí (fig. 46). El pico de oxidación presenta una mayor intensidad.

Resultados

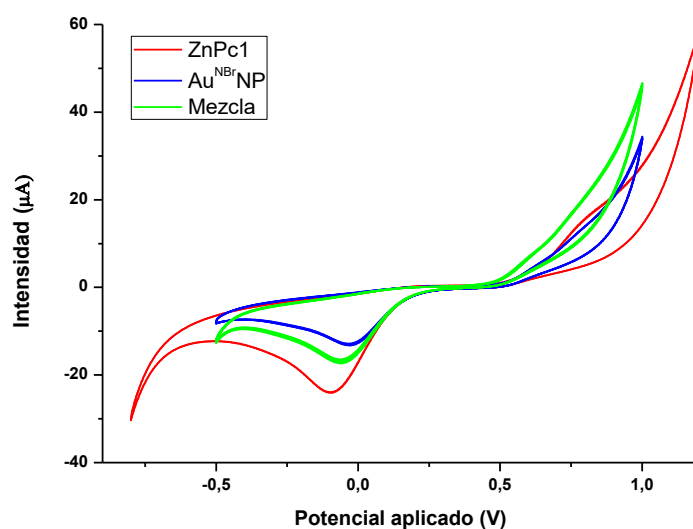


Fig. 46. Voltametría cíclica en catecol 10^{-3} M del sensor modificado con ZnPc1 (en rojo), el sensor modificado con Au^{NBr}NP (en azul) y sensor modificado con la mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1 (en verde).

Para finalizar la caracterización electroquímica de este sensor, se ha medido la cinética para conocer el mecanismo de transferencia de electrones (fig.47). Esta cinética se ha llevado a cabo en catecol 10^{-4} M en un rango de velocidades de barrido desde 10 mV/s hasta 1000 mV/s. Se observa como a medida que aumenta la velocidad los picos se desplazan a potenciales más negativos de manera más acusada que en el caso del sensor con ZnPc1 pero de manera muy similar al sensor con Au^{NBr}NP.

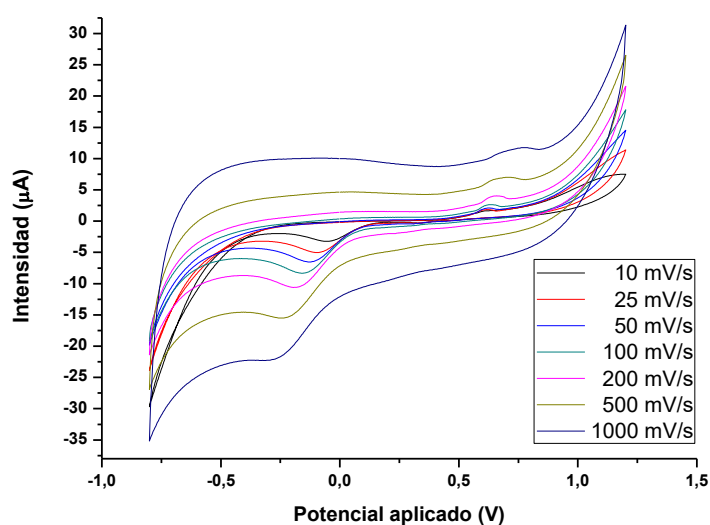


Fig 47. Voltametría cíclica en catecol 10^{-4} M para el sensor modificado con Au^{NBr}NP+ZnPc1 medida en un rango de velocidad desde 10mV/s hasta 1000 mV/s

Con los datos obtenidos de esta voltametría se representaron las gráficas de a figura 48, encontrando que para este sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ sigue una cinética de Laviron ($R^2 = 0,9937$ para la oxidación y $R^2 = 0,9956$ para la reducción). El mecanismo tiene por tanto la etapa limitante en la transferencia de electrones desde el analito hasta el electrodo.

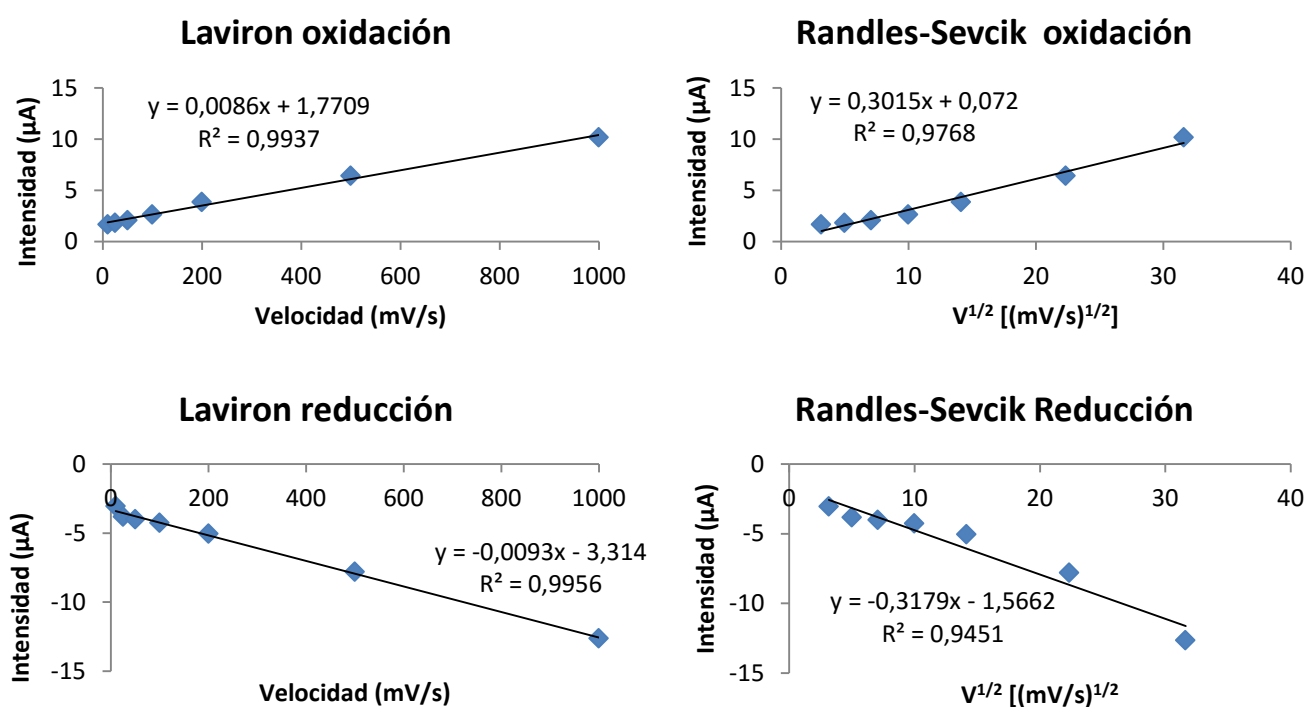


Fig 48. Arriba) Intensidad en catecol 10^{-4}M de la onda anódica a 632 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$. **(Abajo)** Intensidad de la onda catódica en catecol 10^{-4}M a 24 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$

Por último se calcula el límite de detección de este sensor para catecol. Aunque aparentemente el pico de reducción muestra menor intensidad que la ZnPc1 no ocurre así con el límite de detección que detecta concentraciones menores de catecol (a 632 mV, $2,95 \times 10^{-7}\text{M}$ con $R^2 = 0,9979$ para la oxidación y $8,70 \times 10^{-7}\text{M}$ a 24 mV con $R^2 = 0,9941$ para la reducción; fig.49). Se puede decir por tanto que existe un efecto electrocatalítico sinérgico entre $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ y ZnPc1 , ya que además de mejorar los límites de detección de ambos sensores y del sensor sin modificar, los potenciales a los que tiene lugar el proceso redox también están más próximos entre sí.

Resultados

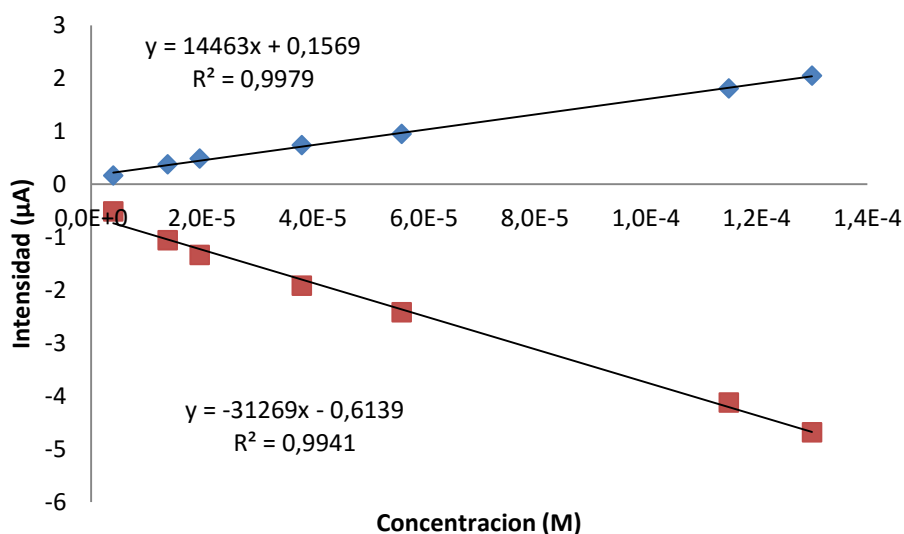


Fig 49. Recta de calibrado a partir de la onda anódica a 632 mV (datos en azul) y de la onda catódica a 24 mV (datos en rojo) de la intensidad de estas ondas frente a diferentes concentraciones crecientes de catecol para el sensor modificado con Au^{NBr}NP+ZnPc1.

4.6. Respuesta electroquímica del sensor modificado con Au^{NBr}NP y ZnPc1 unidos covalentemente

Por último se tratará la caracterización electroquímica del sensor modificado mediante spin-coating con el producto de una reacción llevada a cabo con el objetivo de formar un enlace covalente entre Au^{NBr}NP y ZnPc1 a través del átomo de azufre de esta última (procedimiento detallado en el apartado 3.3.2).

En la voltametría cíclica de este sensor en catecol 10^{-3} M (fig 50) se observa, comparado con el sensor modificado con ZnPc1 y con el sensor modificado con Au^{NBr}NP, que tiene un mayor efecto electrocatalítico sobre la descomposición del agua.

La intensidad del pico de oxidación es mayor que cualquiera de los otros dos, aunque la intensidad del pico de reducción parece similar a la intensidad del pico de Au^{NBr}NP. Los potenciales a los que ocurren los procesos redox, 676 mV para la oxidación y 70mV para la reducción, tienen lugar por tanto a potenciales más positivos y más próximos entre sí.

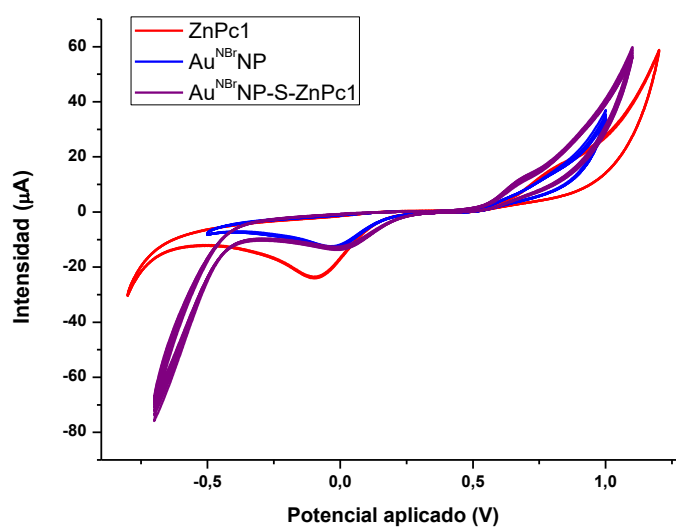


Fig. 50. Voltametría cíclica en catecol 10^{-3}M del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (azul), sensor modificado con ZnPc1 (rojo) y sensor modificado con el producto de la reacción $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$ (morado)

Igualmente se aprecia un aumento de la intensidad de las ondas anódica y catódica conforme aumenta la concentración de catecol (fig.51).

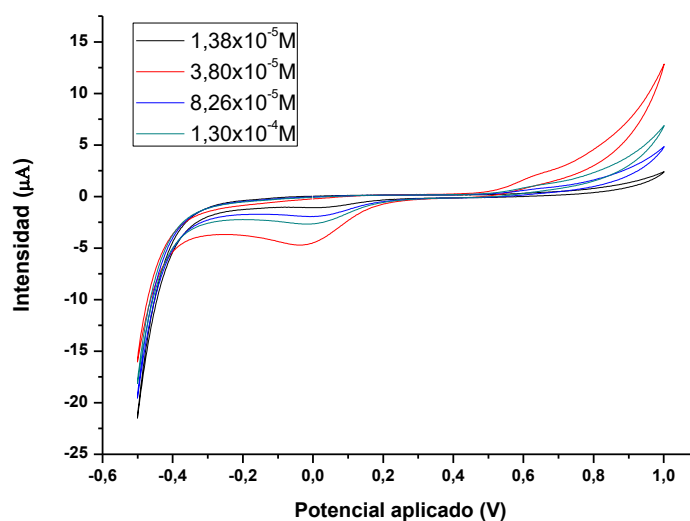


Fig 51. Voltametría cíclica del sensor modificado con $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$ a distintas concentraciones de catecol desde $1,38 \times 10^{-5}\text{M}$ hasta $1,30 \times 10^{-4}\text{M}$.

Resultados

Como último paso en la caracterización del sensor se ha calculado el mecanismo limitante en el transporte de electrones a través de las ecuaciones de Laviron y Randles-Sevcik. Para ello se han realizado voltametrías cíclicas en catecol 10^{-4} M del sensor modificado a distintas velocidades de barrido desde 10 mV/s hasta 1000 mV/s. Puede observarse que a medida que aumentamos la velocidad de barrido, el sensor no soporta bien todos los ciclos y se va degradando (fig 52).

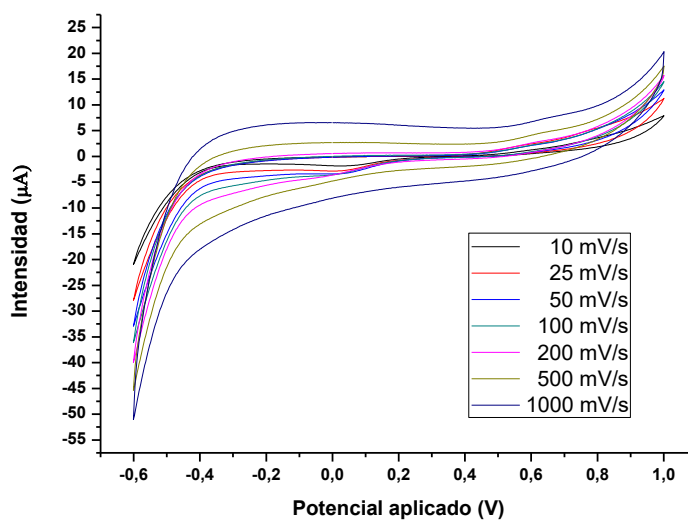


Fig. 52. Voltametría cíclica en catecol 10^{-4} M para el sensor modificado con Au^{NBr}NP-S-ZnPc1 a distintas velocidades de barrido desde 10 mV/s hasta 1000 mV/s

En el ajuste lineal de los datos a las ecuaciones ya mencionadas se obtienen los resultados de la figura 53. Sigue nuevamente una cinética de Laviron, es decir, la etapa limitante es la transferencia de electrones desde el analito hasta el electrodo. La oxidación ocurría a 676 nm y presenta un coeficiente de regresión de $R^2 = 0,9915$ mientras que la reducción tenía lugar a 70 mV con un $R^2 = 0,9729$. Debe tenerse en cuenta que el sensor parece degradarse.

Finalmente se calculan los límites de detección para el catecol del sensor modificado con Au^{NBr}NP-S-ZnPc1 obteniéndose $7,86 \times 10^{-7}$ M para la oxidación y de $1,88 \times 10^{-6}$ M para la reducción (fig. 54)

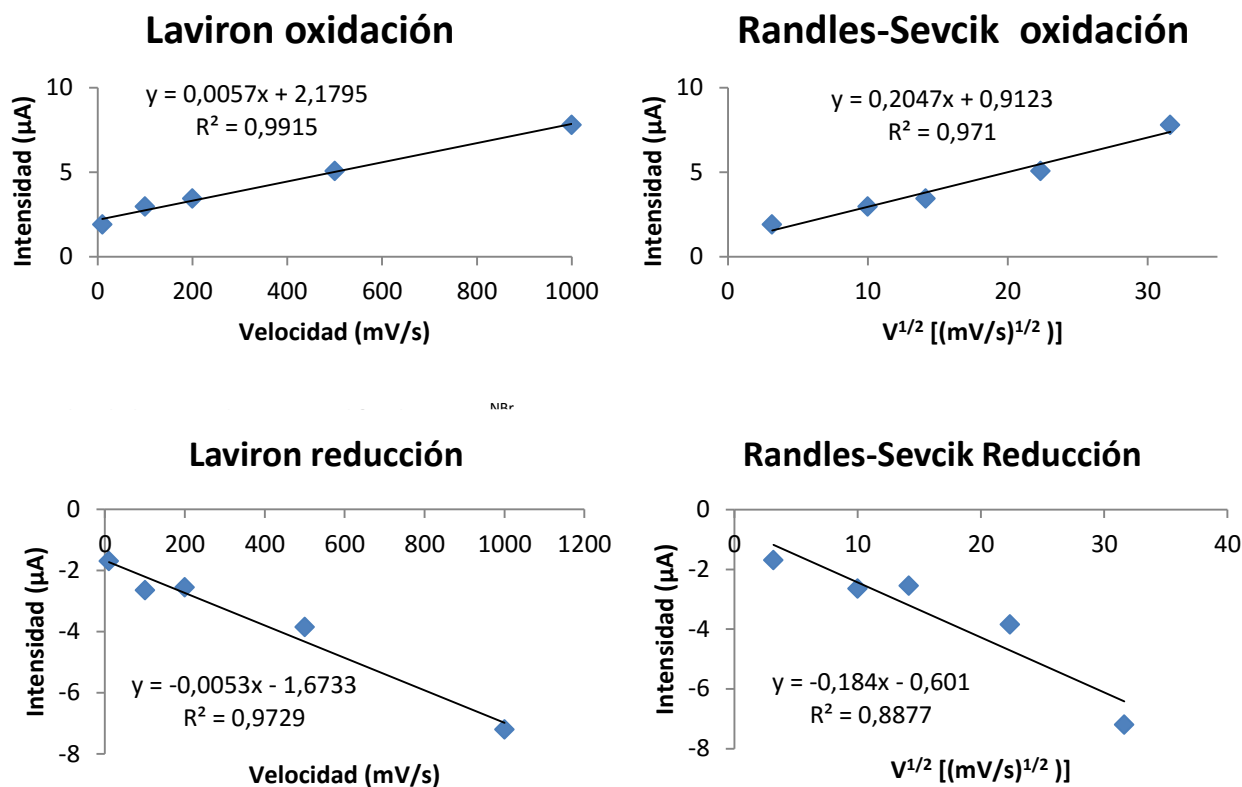


Fig 53. Arriba) Intensidad en catecol $10^{-4}M$ de la onda anódica a 676 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con $Au^{NBr}NP-S-ZnPc1$. **(Abajo)** Intensidad de la onda catódica en catecol $10^{-4}M$ a 70 mV frente a la velocidad de barrido (desde 10 mV/s a 1000 mV/s) y frente a $v^{1/2}$ para el sensor modificado con $Au^{NBr}NP-S-ZnPc1$

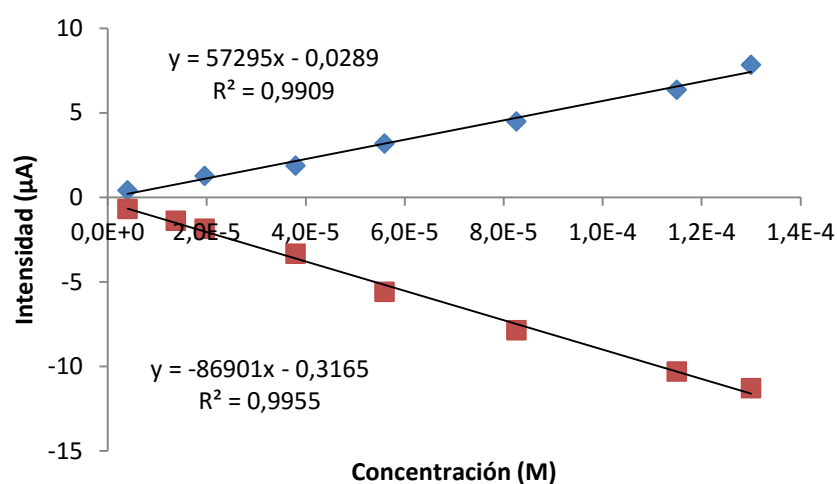


Fig. 54. Recta de calibrado a partir de la onda anódica a 676 mV (datos en azul) y de la onda catódica a 70 mV (datos en rojo) de la intensidad de estas ondas frente a diferentes concentraciones crecientes de catecol para el sensor modificado con $Au^{NBr}NP-S-ZnPc1$.

4.7. Comparación de los sensores

Una vez realizada la caracterización electroquímica de los cuatro sensores distintos expuestos a lo largo de este trabajo se recopilarán todos los resultados con objeto de facilitar una comparación.

La microscopía TEM de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ y $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$ permite observar un halo en torno a la nanopartícula que podría explicarse como una ordenación de la ftalocianina frente a la nanopartícula. Además se estima un incremento en el tamaño de $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ desde 2-3 nm hasta ~ 4 nm para $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ y hasta 6-8 nm para $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$.

En la voltametría cíclica comparada de los cuatro sensores (fig.55) podemos ver que el pico más definido de la oxidación viene dado por el compuesto $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$

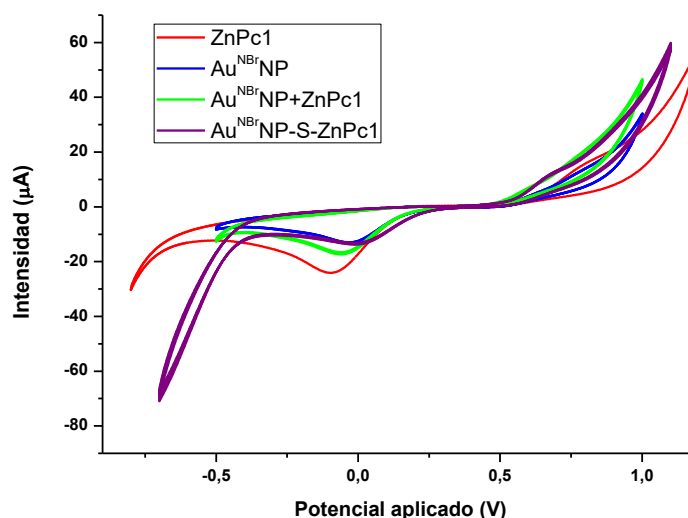


Fig 55. Voltametría cíclica en catecol 10^{-3}M de los sensores modificados con ZnPc1 (en rojo), $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ (en azul), $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ 2.1 (en verde) y $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$ (en morado)

En la siguiente tabla (tabla1) se resumen los datos presentados en este trabajo. Se observa que los mejores límites de detección vienen dados tanto por la mezcla $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}+\text{ZnPc1}$ como por la unión covalente $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP-S-ZnPc1}$.

La de transferencia de electrones dominado por el mecanismo de Randles-Sevcik en los materiales separados pasa a un mecanismo dominado por Laviron cuando estos materiales son combinados, manteniendo el mecanismo inicial del sensor sin modificar.

La velocidad de transferencia de electrones para el sensor modificado con Au^{NBr}NP es mucho mayor que el sensor sin modificar (mayores pendientes). ZnPc1 en la reducción de catecol también muestra una mayor velocidad.

	Sensor	Potencial (mV)	LD (M)	R ²	Cinética	R ²	m
Oxidación	ITO	634	3,84x10 ⁻⁶	0,9938	Laviron	0,9959	0,009
	ZnPc1	783	5,5x10 ⁻⁵	0,9932	Laviron	0,9957	0,0086
	Au ^{NBr} NP	673	4,4x10 ⁻⁶	0,9917	Randles-Sevcik	0,9987	0,4751
	Au ^{NBr} NP+ZnPc1	632	2,95x10 ⁻⁷	0,9979	Laviron	0,9937	0,0086
	Au ^{NBr} NP-S-ZnPc1	674	7,86x10 ⁻⁷	0,9909	Laviron	0,9915	0,0057
Reducción	ITO	2	3,13x10 ⁻⁶	0,9941	Laviron	0,9993	-0,0119
	ZnPc1	-104	5,4x10 ⁻⁶	0,9962	Randles-Sevcik	0,9957	-0,5713
	Au ^{NBr} NP	-26	2,8x10 ⁻⁶	0,9909	Randles-Sevcik	0,9989	-0,562
	Au ^{NBr} NP+ZnPc1	24	8,70x10 ⁻⁷	0,9941	Laviron	0,9956	-0,0093
	Au ^{NBr} NP-S-ZnPc1	70	1,88x10 ⁻⁶	0,9955	Laviron	0,9729	-0,0053

Tabla 1. Resumen de los datos de límite de detección y de cinética presentados en este trabajo del sensor sin modificar así como del sensor modificado con cada uno de los materiales electrocatalíticos utilizados: ZnPc1, Au^{NBr}NP, mezcla Au^{NBr}NP+ZnPc1 y unión covalente Au^{NBr}NP-S-ZnPc1.

5. Conclusions

As a conclusion of this work it can be said:

- ✓ Tetraoctylammonium bromide-gold nanoparticles have been synthesised, $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$. TEM microscopy shows a very low dispersion of size, around 2-3 nm.
- ✓ It has been combined two electrocatalytic materials $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ and ZnPc1 , by different ways: a covalent linked and a mixture. Both were characterised by UV-vis spectroscopy and TEM microscopy.
- ✓ Voltammetric sensors modified with these materials have been developed.
- ✓ Sensor chemically modified with ZnPc1 doesn't show electrocatalytic effect towards catechol. Whereas sensor modified with $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ shows a reduced electrocatalytic effect that is reflected in an increase in the rate of electron transfer.
- ✓ A combination of $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ and ZnPc1 was made. Both, the mixture and the covalent complex show similar performance. This indicates that the covalent link does not intervene directly in the electron transfer.
- ✓ When ZnPc1 and $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$ were combined both covalently and as a mixture, an important electrocatalytic effect was observed due a synergy:
 - Potentials of redox peaks are shifted to lower potentials and less potential difference between the anodic and the cathodic waves.
 - Intensity of the peaks is increased
 - Lower detection limits are reached
 - Higher electron transfer rate in $\text{Au}^{\text{NBr}}\text{NP}$
- ✓ The mixture shows the best detection limits

6. Bibliografía

- [1] Hornyak, Gabor L., et al. Introduction to nanoscience. Editorial CRC press, 2008.
- [2] Moores, A., Gorttmann, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to the theory and applications. *New J. Chem.*, 1121-1132. 2006
- [3] Ortí E. and Brédas J. L.. Electronic structure of metalfree phthalocyanine: A valence effective Hamiltonian theoretical study. *J. Chem. Phys.* 89, 1009 (1988).
- [4] Phthalocyanines. Properties and Applications (Eds.: C. C. Leznoff, A.B.P. Lever), VCH Publishers (LSK) Ltd., Cambridge, 1989, 1993, 1996, vols. 1-4.
- [5] Jiang, J. Functional Phthalocyanine Molecular Materials. Series: Structure and Bonding 135, 1st Ed., (Springer). 2010
- [6] Maya, E.M., García-Frutos, E.M., Vázquez, P., Torres, T., Martín, G., Rojo, G., Agulló-López, F., González-Jonte, R.H., Ferro, V.R., García de la Vega, J.M.G., Ledoux, I. and Zyss. J. (2003). Novel push-pull phthalocyanines as targets for second order nonlinear applications, *J. Phys. Chem.*, 107, pp. 2110-2117.
- [7] Zagal, J.H., Griveau, S., Silva, J.F., Nyokong, T. and Bedioui, F. Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions, *Coord. Chem. Rev.*, 254, pp. 2755–2791. 2010
- [8] De la Torre, G., Nicolau, M. and Torres, T. Phthalocyanines: Synthesis, Supramolecular organization and Physical Properties, (Academic Press, New York) 2001.
- [9] Tkachenko, N.V., Efimov, T.A. and Lemmetyinen, H. Covalent phthalocyaninefullerene dyads: synthesis, electron transfer in solutions and molecular films, *J. Porph. Phthaloc.*, 15, pp. 780-790. 2011
- [10] Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Ortiz, J., Gutiérrez, A.M., Fernández-Lázaro, F. and

Sastre-Santos, A. Control of photoinduced electron transfer in zinc phthalocyanine–peryleneimide dyad and triad by the magnesium ion. *J. Phys. Chem.*, 112, pp. 10744-10752. 2008

[11] Rodríguez-Méndez, M.L. *Encyclopedia of Sensors 9*, eds. Grimes, C. S., Dickey, E.C. and Pishko, M.V., “Sensing properties of phthalocyanines” (America Scientific Publishers. California. USA) pp 111-134. 2006

[12] Lever A.B.P. The phthalocyanines-Molecules of enduring value; a two-dimensional analysis of redox potentials, *J. Porph. Phthaloc.* 3, pp. 488-499. 1999.

[13] Bedioui, F., Griveau, S., Nyokong, T., Appleby, A.J., Caro, C.A., Gulppi, M., Ochoa, G. and Zagal, J.H. Tuning the redox properties of metalloporphyrin and metallophthalocyanine based molecular electrodes for the highest electrocatalytic activity for the oxidation of thiols, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9, pp. 3383-3396. 2007

[14] McKeown, N.B. *Phthalocyanine materials: Synthesis, structure and function*, (Cambridge University Press, Cambridge) 1998

[15] Basova, T., Vladimir, P., Aseel, H., Gumus, G.A.G. and Ahsen, G.V. Phthalocyanine films as active layers of optical sensors for pentachlorophenol detection, *Sens. Actuators B.*, 139, pp. 557-562. 2009

[16] Cook, J. and Chambrier, I. *Porphyrin handbook 17*, Eds. Kadish K.M., Smith, K.M. and Guilard, R. Chapter 108 “Phthalocyanines thin films: Deposition and structural studies” (Academic Press) pp.37-127. 2003

[17] Walter M.G., Rudine A.B., Wamser C., *Porphyrins and phthalocyanines in solar photovoltaic cells*, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 14, 759–792. 2010

[18] Germinario G., Van der Werf I.D., Sabbatini L. Pyrolysis gas chromatography mass spectrometry of two green phthalocyanine pigments and their identification in paint systems. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 115, 175–183. 2015

- [19] Serena Duchi, PhD, Sara Ramos-Romero, PhD, Barbara Dozza, PhD, Marta Guerra-Rebollo, PhD, Luca Cattini, BSC, Marco Ballestri, BSC, Paolo Dambrosio, PhD, Andrea Guerrini, BSC, Giovanna Sotgiu, MS, Greta Varchi, PhD, Enrico Lucarelli, MS, Jeronimo Blanco, PhD. Development of near-infrared photoactivable phthalocyanine-loaded nanoparticles to kill tumor cells: An improved tool for photodynamic therapy of solid cancers. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12, 1885–1897. 2016
- [20] *The Phthalocyanines* (Eds.: F. H. Moser, A. L. Thomas), C. R. C. Press, Boca Raton, Florida, 1983, vols. 1, 2.
- [21] M. J. Cook, I. Chambrier en *The Porphyrin Handbook* (Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), R. Academic Press, San Diego 2003, vol. 17, pp. 37.
- [22] E. Roduner, Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev* 35, 583. 2006
- [23] G.A. Ozin, A.C. Arsenault, *Nanochemistry. A chemical approach to nanomaterials*, RSC Publishing, Cambridge (UK), 2005.
- [24] Rotello V., *Nanoparticles: building blocks for nanotechnology* (Series: Nanostructure Science and Technology), Springer, 2004, ISBN: 9780306482878.
- [25] Gogotsi Y., *Nanomaterials Handbook*, CRC Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2006, ISBN: 9780849323089.
- [26] Daniel M.C, D. Astruc. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev* 104, 293. 2004
- [27] Leznoff, C.C. and Lever, A.B.P. (1989-1996) *Phthalocyanines, Properties and applications*, 1-4, (VCH Publishers, New York)
- [28] Martínez, Joaquín C. G. De nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros a clúster con monocapa orgánica. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, vol. 102, no 4, p. 23-29, 2006.

- [29] Ghosh, Sujit K., et al. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chemical Reviews*, vol. 107, no 11, p. 4797-4862, 2007.
- [30] Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien speziell kolloidaler Goldlösungen (contributions to the optics of diffuse media, especially colloid metal solutions). *Ann Phys*; 25:377–445. 1908
- [31] Weibing Qiang, Haiping Liu, Wei Li, Xiang Chen, Danke Xu. Label-free detection of adenosine based on fluorescence resonance energy transfer between fluorescent silica nanoparticles and unmodified gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, Volume 828, Pages 92-98. 2014
- [32] Hai-Bo Wang, Hong-Ding Zhang, Ying Chen, Ke-Jing Huang, Yan-Ming Liu. A label-free and ultrasensitive fluorescent sensor for dopamine detection based on double-stranded DNA templated copper nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 220, Pages 146-153. 2015
- [33] Mohammad Hossein Mashhadizadeh, Rasoul Pourtaghavi Talemi. Synergistic effect of magnetite and gold nanoparticles onto the response of a label-free impedimetric hepatitis B virus DNA biosensor. *Materials Science and Engineering: C*, Volume 59, Pages 773-781. 2016
- [34] Stephanie Vial, Rui L. Reis, J. Miguel Oliveira. Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, In press 2016
- [35] Rabee Cheheltani, Rami M. Ezzibdeh, Peter Chhour, Kumidini Pulaparathi, Johoon Kim, Martina Jurcova, Jessica C. Hsu, Cassidy Blundell, Harold I. Litt, Victor A. Ferrari, Harry R. Allcock, Chandra M. Sehgal, David P. Cormode. Tunable, biodegradable gold nanoparticles as contrast agents for computed tomography and photoacoustic imaging. *Biomaterials*, Volume 102, Pages 87-97. 2016
- [36] Tianxun Gong, Ying Cui, Douglas Goh, Kong Kien Voon, Perry Ping Shum, Georges Humbert, Jean-Louis Auguste, Xuan-Quyen Dinh, Ken-Tye Yong, Malini Olivo. Highly sensitive SERS detection and quantification of sialic acid on single cell

using photonic-crystal fiber with gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 64, Pages 227-233. 2015

[37] P. Justin Jesuraj, K. Jeganathan, M. Navaneethan, Y. Hayakawa. Far-field and hole injection enhancement by noble metal nanoparticles in organic light emitting devices. *Synthetic Metals*, Volume 211, Pages 155-160. 2016

[38] A. De Barros, C.J.L. Constantino, J.R.R. Bortoleto, N.C. Da Cruz, M. Ferreira. Incorporation of gold nanoparticles into Langmuir-Blodgett films of polyaniline and montmorillonite for enhanced detection of metallic ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 236, Pages 408-417. 2016

[39] Rajni Bala, Munish Kumar, Kavita Bansal, Rohit K. Sharma, Nishima Wango. Ultrasensitive aptamer biosensor for malathion detection based on cationic polymer and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 85, Pages 445-449. 2016

[40] Medina-Plaza C, de Saja JA, Rodriguez-Mendez ML. Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes. *Biosens Bioelectron*; 57:276-83. 2014

[41] R.J. Hansman, Jr., Characteristics of instrumentation, in: J.G. Webster (ed.). *Controlled oscillators and their applicability to sensors*, in: L. Ristic (Ed.), *Sensors Technology and Devices*, Chapter 13, Artech House, Norwood (MA), 1994

[42] Raja Jurdak, Alberto Elfes, Branislav Kusy, Ashley Tews, Wen Hu, Emili Hernandez, Navinda Kottege, Pavan Sikka . Autonomous surveillance for biosecurity. *Trends in Biotechnology*, Volume 33, Issue 4, Pages 201-207. 2015

[43] G.A. Zelada-Guillen, J. Riu, A. Duzgun, F.X. Rius. Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48, pp. 7334–7337. 2009

[44] P.B. Lillehoj, C.W. Kaplan, J. He, W. Shi, C.M. Ho. Rapid, electrical impedance detection of bacterial pathogens using immobilized antimicrobial peptides. *J. Lab. Autom.*, 19, pp. 42–49. 2014

- [45] Mohsen Golabi, Anthony P.F. Turner, Edwin W.H. Jager. Tunable conjugated polymers for bacterial differentiation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 222, Pages 839-848. 2016
- [46] A.K. Turner, Isao. *Biosensor: fundamentals and applications*, ed. O.U. Press., New York (1987),
- [47] Eggins, B. R., *Biosensors: An Introduction*, Wiley, Chichester, UK, 1996
- [48] Thévenot DR1, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*;16(1-2): 121-31. 2001
- [49] C.H. Hamann, A. Hamnett, W. Vielstich, Wiley-VCH. *Electrochemistry Chapter 5*. Weinheim, 1998.
- [50] A.J. Bard, L.R. Faulkner, John Wiley and Sons *Electrochemical Methods*, New York, 2001.
- [51] Apetrei, C., Apetrei, I., de Saja, J.A. and Rodriguez-Méndez, M.L. Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of antioxidants, *Sensors*, 11, pp. 1328-1344. 2011
- [52] Gooding, J. J. *Electrochemistry at nanoscale nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing*, *Electrochim. Acta*, 50, pp. 3049-3060. 2005
- [53] Wang, J., Pamidi, P.V.A., Parrado, C., Su Park, D. and Pingarron, J. Sol-gel-derived cobalt phthalocyanine-dispersed carbon composite electrodes for electrocatalysis and amperometric flow detection, *Electroanalysis*, 9, pp. 908–911. 1997
- [54] Cosnier, S., Karyakin, A., Alpatova, N.M. and Ovsyannikova, E.V. *Electropolymerization: Concepts, materials and applications*, Chapter 6 “Electropolymerization of Phthalocyanines” Wiley-VCH Verlag GmbH) pp. 111-130. 2010.
- [55] Obirai, J., Rodrigues, N.P., Bedoui, F. and Nyokong, T. Synthesis, spectral and electrochemical properties of a new family of pyrrole substituted cobalt, iron,

manganese, nickel and zinc phthalocyanine complexes, *J. Porph. Phthaloc.*, 7, pp. 508-520. 2003.

[56] Wang, Y.F., Zhang, X.R., Ye, Y.C., Liang, D.J., Wang, Y. and Wu, K. Self-assemblies of Oxovanadium Phthalocyanine Molecules and Nanoclusters on Highly Oriented Pyrolytic Graphite, *Acta Physico-Chimica Sinica*, 26, pp. 933-938. 2010

[57] Yang, Z.Y., Gan, L.H., Lei, S-B., Wan, L-J., Wang, C. and Jiang, J.Z. Self-Assembly of PcOC8 and Its sandwich lanthanide complex Pr (PcOC8)₂ with oligo (Phenylene-ethynylene) molecules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 109, pp. 19859-19865.

[58] Alencar, W.S., Crespilho, F.N., Martins, M.V.A., Zucolotto, V., Oliveira, O.N.Jr. and Silva, W.C. Synergistic interaction between gold nanoparticles and nickel phthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC), *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, pp.5086-5091. 2009

[59] Ferreira, M., Zucolotto, V., Oliveira, O. N. Jr. and Wohnrath, K. *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology* 4, ed. Nalwa, H.S. (American Scientific Publishers, Los Angeles) pp. 441-460. 2003

[60] Arrieta, A., Rodriguez-Mendez, M.L. and de Saja, J.A. Langmuir–Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste, *Sens. Actuators B.*, 95, pp. 357-365. 2003

[61] Valli, L. Phthalocyanine-based Langmuir–Blodgett films as chemical sensors, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 116, pp. 13-44. 2005

[62] Roberts, M.E., Mannsfeld, S.C.B., Queralto, N., Reese, C., Locklin, J., Knoll, W. and Bao, Z. Water-stable organic transistors and their application in chemical and biological sensors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, pp. 12134-12139. 2008

[63] Rella, R., Spadavecchia, J., Ciccarella, G., Siciliano, P., Vasapollo, G. and Valli, L. Optochemical vapour detection using spin coated thin films of metal substituted phthalocyanines, *Sens. Actuators B.*, 89, pp. 86-91. 2003

- [64] Agnes Purwidyantri, Ching-Hsiang Chen, Bing-Joe Hwang, Ji-Dung Luo, Chiuan-Chian Chiou, Ya-Chung Tian, Chan-Yu Lin, Chi-Hui Cheng, Chao-Sung Lai. Spin-coated Au-nanohole arrays engineered by nanosphere lithography for a *Staphylococcus aureus* 16S rRNA electrochemical sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 77, Pages 1086-1094. 2016
- [65] Bin Wang, Zhimin Chen, Xia Zuo, Yiqun Wu, Chunying He, Xiaolin Wang, Zan Li. Comparative NH₃-sensing in palladium, nickle and cobalt tetra-(tert-butyl)5,10,15,20-tetraazaporphyrin spin-coating films. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 160, Issue 1, Pages 1-6. 2015
- [66] Ki Jung Lee, Haekwan Oh, Minuk Jo, Keekeun Lee, Sang Sik Yang. An ultraviolet sensor using spin-coated ZnO nanoparticles based on surface acoustic waves. *Microelectronic Engineering*, Volume 111, Pages 105-109. 2013
- [67] Wenjing Wang, Lu Wang, Lina Zou, Gaiping Li, Baoxian Ye. A novel voltammetric sensor based on poly(1-Citrulline)/SWCNTs composite film modified electrode for sensitive determination of picoside II. *Talanta*, Volume 150, Pages 346-354. 2016
- [68] Abbas Arabzadeh, Abdollah Salimi. Novel voltammetric and impedimetric sensor for femtomolar determination of lysozyme based on metal-chelate affinity immobilized onto gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 74, Pages 270-276. 2015
- [69] B.B. Petković, D. Stanković, M. Milčić, S.P. Sovilj, D. Manojlović. Dinuclear copper(II) octaazamacrocyclic complex in a PVC coated GCE and graphite as a voltammetric sensor for determination of gallic acid and antioxidant capacity of wine samples. *Talanta*, Volume 132, Pages 513-519. 2015
- [70] Katarzyna Tyszczyk-Rotko, Ilona Sadok, Mariusz Barczak, Magdalena Jabłońska-Czapla. A new voltammetric sensor based on thiol-functionalized polysiloxane film modified by lead nanoparticles for detection of Bi(III) ions. *Electrochimica Acta*, Volume 208, Pages 102-108. 2016
- [71] Meyerhofer D. Characteristics of resist films produced by spinning. *J Appl Phys* 49(7):3993–3997. 1978

- [72] Shinar, Joseph (Ed.) *Organic Light-Emitting Devices: A Survey*; Springer-Verlag: New York, 2004.
- [73] B. Lochel, A. Maciossek, H. J. Quenzer, and B. Wagner, "Ultraviolet Depth Lithography and Galvanofarming for Micromachining," *J. Electrochem. Soc.* 143, 237-244 .1996.
- [74] C. J. Drury¹, C. M. J. Mutsaers¹, C. M. Hart¹, M. Matters¹ and D. M. de Leeuw¹. Low-cost all-polymer integrated circuits. *Appl. Phys. Lett.* 73, 108. 1998
- [75] Ng, V.; Lee, Y. V.; Chen, B. T.; Adeyeye, A. O. Nanostructure array fabrication with temperature controlled self-assembly techniques. *Nanotechnology*, 13, 554-558. 2002
- [76] A. Yen, H.I. Smith, M.L. Schattenburg, and G.N. Taylor. "An Anti-Reflection Coating for use with PMMA at 193 nm", *J. Electrochem. Soc.*, 139, 616-619. 1992
- [77] Y Ishihara, T Hirai, C Sakurai, T Koyanagi, H Nishida, M Komatsu. Applications of the particle ordering technique for conductive anti-reflection films. Pages 50-55. Ishihara, Y.; Hirai, T.; Sakurai, C.; Koyanagi, T.; Nishida, H.; Komatsu, M. *Thin Solid Films*, 411, 50. 2002
- [78] Geng, Y. Y.; Gu, D. H.; Gan, F. X. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced technology*, 110, 115. 2004
- [79] Medina-Plaza, C., García-Cabezón, C., García-Hernández, C., Bramorski, C., Blanco-Val, Y., Martín-Pedrosa, F., Kawai, T., De Saja, J.A., Rodríguez-Méndez, M.L. Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir–Blodgett films based on functionalized nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 853, 572-578. 2015
- [80] M.L. Rodríguez Méndez. C. Medina, J.A. de Saja, C. Apetrei, R. Muñoz. Sensor Arrays Based On Phthalocyanines: New Developments On Nanostructured And Biomimetic Electrochemical Sensors. In: *Multisensor systems for chemical analysis: materials and sensors*. L. Lvova, D. Kirsanov, C. Di Natale, and A. Legin (Eds.). Singapore: Pan Stanford Publishing, 2012.

- [81] Parra, V., Arrieta, A., Fernandez-Escudero, J.A., García, H., Apetrei, C., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. E-tongue based on a hybrid array of voltammetric sensors based on phthalocyanines, perylene derivatives and conducting polymers: Discrimination capability towards red wines elaborated with different variety of grapes. *Sensors and Actuators-B*, 115 (1), 54-61. 2016
- [82] Parra, V., Hernando, T., Rodriguez-Mendez, M.L., de Saja, J.A. Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines. *Electrochimica Acta*, 49 (28), 5177-5185. 2004
- [83] Rodriguez-Mendez, M.L., Parra, V., Apetrei, C., Gay, M., Prieto, N., de Saja, J.A. Electronic tongue based on voltammetric electrodes modified with electroactive materials showing complementary electroactive properties.. Applications. *Microchimica Acta*, 163 (1-2), 23-31. 2008
- [84] Medina-Plaza, C., Revilla, G., Munoz, R., Fernandez-Escudero, J.A., Barajas, E., Medrano, G., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. Electronic tongue formed by sensors and biosensors containing phthalocyanines as electron mediators. Application to the analysis of red grapes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 18 (1-2), 76-86. 2014
- [85] T. Nyokong and E. Antunes, Influence of nanoparticles on the photophysical behavior of phthalocyanines *Coord. Chem. Rev.* 257, 2401-2418. 2013
- [86] Chauke V.P., Chidawanyika W., Nyokong T. The electrochemical behavior of gold nanoparticle tantalum (V) phthalocyanine composites: Applications towards the electroanalysis of bisphenol A. *Electroanalysis*.;23:487–496. 2011
- [87] C. Medina-Plaza, L.N. Furini, C.J.L. Constantino, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Mendez. Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines. *Analytica Chimica Acta*,851, 95-102. 2014

- [88] L. Luximon-Ramna, T. Bahorun, A. Crozier. Antioxidant action and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 83, pp. 496–502. 2003
- [89] S. Toyokuni, T. Tanaka, W. Kawaguchi, N.R.R. Fang, M. Pzeki, S. Akatsuka, H. Hiai, O.I. Aruoma, T. Bahorun. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radical Res.*, 37, pp. 1215–1224. 2003
- [90] Y. Caia, Q. Luob, M. Sunc, H. Corkea. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 72, pp. 2157–2184. 2004
- [91] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, 20 (7), pp. 933–938. 1996
- [92] L. Valgimigli, R. Amorati, M.G. Fumo, G.A. Dilabio, G.F. Pedulli, K.U. Ingold, D.A. Pratt. The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular oxygen. *J. Org. Chem.*, 73, pp. 1830–1841. 2008
- [93] E. Bendary, R.R. Francis, H.M.G. Ali, M.I. Sarwat, S. El Hady. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*. Volume 58, Issue 2, Pages 173–181. 2013
- [94] Gay, M., Diez-Arevalo, E., De Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. Electrochemical quartz crystal microbalance analysis of the oxidation reaction of phenols found in wines at lutetium bisphthalocyanine electrodes. *Sensors and Actuators-B*, 185, 24-31. 2013
- [95] M. Gay Martín, J.A. de Saja, R. Muñoz, M.L. Rodríguez-Méndez. Multisensor system based on bisphthalocyanine nanowires for the detection of antioxidants. *Electrochimica Acta*, 68, 88-94. 2012

[96] Vicente M. Blas-Fernando, Javier Ortiz, Fernando Fernandez-Lázaro, Ángela Satre-Santos. Synthesis and characterization of a sulfur-containing phthalocyanine-gold nanoparticle hybrid. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* , 19, 1-9. 2015

[97] E. Laviron. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. *Electroanalytical Chemistry and Interracial Electrochemistry*, 52, 355-393. 1974

[98] E. Laviron. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.*, 101, 19-28. 1979