



Universidad de Burgos

Departamento de Química

Área de Química Analítica

DESARROLLO DE DIFERENTES SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORURO

Julia Bujes Garrido

Burgos 2017

Tesis Doctoral



ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BURGOS

Memoria de investigación titulada **“Desarrollo de diferentes sensores electroquímicos para la determinación de cloruro”** presentada para optar al Grado de Doctora en la Universidad de Burgos.

Fdo.: Julia Bujes Garrido



Facultad de Ciencias
Pza. Misael Bañuelos, s/n
09001 Burgos



ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BURGOS

Dña. M. Julia Arcos Martínez, Catedrática de Universidad del
Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

INFORMA FAVORABLEMENTE sobre la presente Tesis Doctoral, titulada
*“Desarrollo de diferentes sensores electroquímicos para la determinación
de cloruro”*, realizada en el Área de Química Analítica del Departamento
de Química de la Universidad de Burgos por Dña. Julia Bujes Garrido.

Y para que así conste, firma el presente informe en Burgos, a 14 de
marzo de 2017.

Fdo.: M. Julia Arcos Martínez



Facultad de Ciencias
Pza. Misael Bañuelos, s/n
09001 Burgos

Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de este camino.

En primer lugar, quiero agradecer de forma especial y sincera a mi directora, Julia Arcos, por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su ayuda, confianza y dedicación en él.

Me gustaría también agradecer a mis compañeros de laboratorio por todos los buenos momentos vividos, por su ayuda recibida, y por hacer el día a día mucho más sencillo a su lado.

Quiero dar las gracias a mi familia por su constante motivación, apoyo incondicional y por estar siempre, tanto en los momentos malos como en los buenos.

Por último, quiero dar las gracias a mi pareja y amigos, porque sin vuestro amor y cariño el camino hubiera resultado mucho más difícil. Gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme, motivarme y acompañarme hasta el final de esta etapa.

Muchas gracias de corazón porque todos y cada uno de vosotros habéis aportado vuestro granito en este trabajo.

Desarrollo de diferentes sensores electroquímicos para la determinación de cloruro

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	11
2. Objetivos.....	17
3. Fundamentos teóricos y antecedentes bibliográficos.....	21
3.1. El ion cloruro. Importancia de su análisis.....	23
3.1.1- El cloruro en el agua potable.....	25
3.1.2.-El cloruro en aguas salinas.....	27
3.1.3.-El cloruro en líquidos biológicos.....	29
3.2 Métodos de análisis para la determinación de cloruro.....	34
3.3 Técnicas electroquímicas.....	38
3.3.1 Potenciometría.....	38
3.3.2 Técnicas de barrido de potencial.....	40
3.4 Sensores electroquímicos serigrafados.....	42
3.4.1 Electrodo serigrafado “wearables”.....	45
3.4.2. Electrodo serigrafado modificado con nanopartículas.....	46
3.5 Métodos electroanalíticos para la determinación de cloruro.....	48
3.6 Espectroelectroquímica.....	54
3.7 Referencias.....	56
4. Disposable sensor for electrochemical determination of ions.....	71
4.1 Introduction.....	75

4.2 Material and methods.....	78
4.2.1 Reagents and solutions.....	78
4.2.2 Apparatus.....	79
4.2.3 Sensor manufacturing.....	80
4.2.4 Electrochemical measurements.....	80
4.3 Results and discussion	81
4.3.1 Interferences	86
4.3.2 Application to sea water and saline samples.....	88
4.4 Conclusions.....	89
4.5 References.....	90
5. Development of a wearable electrochemical sensor for voltammetric determination of chloride ions	97
5.1 Introduction.....	101
5.2 Experimental	104
5.2.1 Reagents and solutions.....	104
5.2.2 Apparatus.....	105
5.2.3 Sensor manufacturing.....	105
5.2.4. Electrochemical measurements.....	105
5.3 Results and discussion	106
5.3.1 Study of manufactured flexible and wearable sensors.....	106
5.3.2 Determination of chloride ions using a Gore-Tex® sensor.....	108

5.3.3 Application to sea water	111
5.4 Conclusions	112
5.5 References	113
6. Determination of halides using Ag nanoparticles–modified disposable electrodes. A first approach of a wearable sensor for monitoring of chloride ions.....	119
6.1 Introduction	123
6.2 Experimental.....	125
6.2.1 Reagents and solutions	125
6.2.2 Apparatus	126
6.2.3 Sensor manufacturing.....	127
6.2.4 Silver nanoparticles modified SPCEs preparation/characterization	127
6.2.5 Voltammetry measurements	128
6.2.6 Spectroelectrochemical measurements	128
6.3 Results and discussion.....	128
6.3.1 Chloride effect studied by UV/Vis absorption spectroelectrochemistry using a PET sensor	131
6.3.2 Spectroelectrochemistry measurements using Gore–Tex® sensors	134
6.3.3 Electrochemical determination of halide ions using PET sensors	136
6.3.4. Determination of chloride ions using a Gore–Tex® sensor.....	138
6.3.5 Application to synthetic sweat sample.....	138
6.4 Conclusions	139

6.5 References.....	141
7. Conclusiones.....	145

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AgNPs	Nanopartículas de plata
AgNPs-SPEs	Electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de plata
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CV	Voltamperometría cíclica
DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos
FeMeOH	Ferrocenometanol
IC	Cromatografía iónica
ISE	Electrodo selectivo de iones
LSV	Voltamperometría lineal
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización mundial de la salud
PRE	Electrodo de pseudo referencia
RSD	Desviación estándar relativa
SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono
SPCFeMeOHEs	SPCEs modificados con FeMeOH
SPC _{K₃[Fe(CN)₆]} Es	SPCEs modificados con ferricianuro potásico
SPC _{K₄[Fe(CN)₆]} Es	SPCEs modificados con ferrocianuro potásico
SPEs	Electrodos serigrafiados

1. INTRODUCCIÓN

La puesta a punto de dispositivos que permitan el control rápido, seguro, preciso y económico de diversas especies sigue siendo una necesidad no sólo en una gran variedad de sectores industriales como el farmacéutico o el alimentario, sino en áreas de gran sensibilidad e impacto en la sociedad actual como la medioambiental, clínica, deportiva, etc. De hecho, durante esta última década el desarrollo y las aplicaciones de sensores portátiles se han incrementado notablemente adquiriendo un gran protagonismo en el campo del análisis químico.

Los últimos avances en sensores electroquímicos se han llevado a cabo utilizando novedosas metodologías de fabricación lo que ha permitido, junto con la introducción de notables mejoras en las técnicas de análisis, la integración de los mismos en distintos sistemas de monitorización para el control de diferentes parámetros. Éste es el caso de los sensores electroquímicos impresos sobre un material textil, “wearable sensors”, orientados para proporcionar información en tiempo real, y mejorar la atención sanitaria personalizada mediante el seguimiento de parámetros físicos y químicos de determinados pacientes. Igualmente, pueden ser de gran utilidad para la obtención de información sobre el entorno, alertando de la presencia de algún agente contaminante o de la existencia de algún peligro químico [1].

Desde esta perspectiva, el trabajo presentado en esta Memoria se centra en la construcción de sensores miniaturizados, desechables, sensibles y selectivos mediante la utilización de tecnologías de microfabricación serigráfica para el análisis de haluros, más concretamente del ion cloruro. La impresión de sensores electroquímicos ha permitido la obtención masiva y en serie de dispositivos uniformes en tamaño y geometría, con un reducido coste económico que mejoran la

reproducibilidad de las medidas que se efectúen con ellos. La utilización de técnicas de serigrafiado para la puesta a punto de sensores susceptibles de ser utilizados para distintos fines, muestra una gran versatilidad debido a la posibilidad de emplear distintos sustratos de impresión y de modificar las tintas de serigrafiado con nanomateriales y otras sustancias, ofreciendo un gran abanico de posibilidades [2].

De hecho, la modificación de los electrodos de trabajo con nanopartículas de Ag (AgNPs), introduce una vía interesante en la puesta a punto de sensores para la determinación de haluros, aprovechando la fuerte interacción existente entre el ion plata y los distintos haluros.

La Memoria se ha estructurado en VII capítulos. En primer lugar, se describe la importancia del análisis del ion cloruro desde un punto de vista biológico y medioambiental, así como los métodos de análisis que se han desarrollado para su determinación. Con más profundidad, se presentan los métodos descritos en bibliografía basados en la utilización de técnicas electroquímicas, los cuales se muestran como una buena alternativa debido a sus ventajas relacionadas con su elevada sensibilidad, el reducido coste de instrumentación y la posibilidad de poder realizar análisis "in situ".

El capítulo IV aborda el desarrollo de un sensor basado en la medida del desplazamiento de un pico voltamperométrico de una especie de control, como consecuencia de la utilización de un pseudo electrodo de referencia cuyo potencial se ve afectado por la presencia de haluros. Igualmente, se ha demostrado la utilidad del sensor para el análisis de cloruros en agua de mar.

El capítulo V se centra en el estudio de la influencia de diferentes soportes de impresión de los sistemas electródicos, incluyendo algunos textiles, en las señales electroquímicas, y se demuestra la viabilidad de trasponer el sensor desarrollado en el anterior capítulo a un soporte textil con objeto de obtener una primera aproximación a un dispositivo que pueda considerarse “wearable”.

La modificación con AgNPs del electrodo de trabajo, aumenta considerablemente la sensibilidad en la determinación de cloruro como queda reflejado en el capítulo VI, donde se describe el desarrollo de un sensor para haluros basado en el uso de un electrodo sobre el cual se depositan electroquímicamente AgNPs de una manera simple y rápida. También, queda demostrado en este capítulo, la viabilidad de modificar con nanopartículas metálicas una superficie electródica impresa en un textil, resultando de gran interés por su potencial utilidad para desarrollar sensores destinados para aplicaciones biomédicas.

Finalmente, en el capítulo VII quedan recogidas las conclusiones más importantes de este trabajo.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la puesta a punto de sensores electroquímicos específicos, reproducibles, desechables y sensibles que contribuyan al desarrollo de sensores utilizables “in situ”, susceptibles a integrarse en sistemas miniaturizados. Se pretende abrir nuevas posibilidades en la fabricación de dispositivos de medida serigrafiados sobre sustratos textiles para la monitorización y el control de especies.

Este objetivo global abarca los objetivos concretos que se describen a continuación:

1. Analizar las posibilidades de soportes de distintos materiales y seleccionar los sustratos óptimos para la fabricación de transductores electroquímicos susceptibles de ser integrados en textiles.
2. Desarrollar sensores serigrafiados que permitan la determinación electroquímica de haluros.
3. Explorar las posibilidades de la funcionalización con AgNPs para aumentar la sensibilidad de los sensores desarrollados para la determinación de haluros.
4. Identificar las reacciones electroquímicas observadas en cada caso y analizar la utilidad de la espectroelectroquímica en la identificación de los mecanismos de reacciones electródicas.
5. Optimizar las variables influyentes y caracterizar los sensores desarrollados determinando su precisión y límite de detección.

6. Validar los sensores desarrollados analizando iones cloruro en muestras de distinta naturaleza.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.1 El ion cloruro. Importancia de su análisis

Los iones cloruro son uno de los iones más abundantes de nuestro hábitat y tienen un papel fundamental en muchos sectores de actividad tales como el medioambiental, agroalimentario, sanitario o industrial [3]. Especialmente, la presencia de estos iones en las aguas de nuestro entorno y en las que se utilizan para las actividades habituales es un aspecto muy importante que es preciso controlar por su influencia directa en diferentes tipos de contaminación, procesos de degradación en los materiales, así como trastornos fisiológicos en los seres vivos.

La cantidad de sal en el suelo, es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en los estudios agronómicos y ambientales, por lo que el ion cloruro es un importante indicador en los temas relacionados con la gestión agrícola [4, 5]. El exceso de salinidad de las tierras de cultivo puede conducir a la degradación y exclusión de la producción agrícola. Por lo tanto, el efecto de las sales sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas del suelo es de gran relevancia. La presencia de sales solubles provoca un aumento de potencial osmótico del agua del suelo, que puede dar como resultado la muerte de microorganismos. Un aumento de la conductividad eléctrica del suelo puede dar lugar a una disminución de la respiración del medio. Tanto los bromuros como los cloruros pueden influir indirectamente en la actividad microbiana del suelo debido a sus efectos adversos sobre las lombrices de tierra que son las responsables de descomponer la materia orgánica. Los altos niveles de salinidad pueden inhibir el crecimiento y la

reproducción de las lombrices de tierra o incluso conducir a muertes masivas. Como consecuencia, la elevada salinidad puede inhibir el crecimiento de las plantas [6, 7].

Por otra parte, la corrosión inducida por los iones cloruro sobre muchos materiales es responsable de muchos problemas que aparecen en diferentes tipos de infraestructuras. Por ejemplo, es una de las causas más comunes de degradación de estructuras de hormigón armado. La corrosión inducida por el cloruro se presenta sobre todo en estructuras expuestas al medio marino. Los iones cloruro están presentes en el agua de mar, pero es posible que también los desplace el viento de la brisa marina a la zona costera y los deposite en estructuras de hormigón construidas cerca del mar. También, la presencia de cloruros en el agua de amasado incrementa el riesgo de corrosión.

La acumulación de productos de corrosión en la interfaz acero-hormigón origina tensiones internas que con frecuencia conducen a grietas y, en última instancia a la delaminación de la cubierta de hormigón. Concretamente, los iones cloruro pueden destruir una capa fina de pasivado, causada por la alta alcalinidad del hormigón al final de la construcción, que protege las barras de acero contra la corrosión dando lugar a una reducción sustancial de la sección transversal de las varillas y, por lo tanto, afectando a las propiedades mecánicas de la estructura total provocando graves problemas de seguridad en el hormigón armado. Este proceso de deterioro genera mayores costos de reparación y mantenimiento con un impacto severo en la durabilidad y el rendimiento del ciclo de hormigón. La mejor manera de evitar el daño inducido por la corrosión es a través de la prevención incluyendo la

supervisión del medio ambiente y la determinación del contenido de cloruro en el hormigón [8-10].

Siendo su importancia crucial en muchos hábitats, la cuantificación de cloruro en aguas de consumo ha sido siempre de especial interés ya que está ligada directamente a las características organolépticas de éstas e incide directamente en la salud de los consumidores.

3.1.1- El cloruro en el agua potable

La necesidad de agua y su uso constituyen la base de todos los seres vivos ya que es indispensable para la vida. Dos tercios de nuestro cuerpo está compuesto por agua por lo que nuestro metabolismo requiere de ella para su funcionamiento.

El 97% del planeta Tierra está compuesto por agua salada, y el otro 3% es agua dulce. De la cantidad de agua dulce que se dispone, en realidad sólo un 0.003% es apta para el consumo. Esto se debe a que el 2% está retenida en los casquetes polares y glaciares, el 0.6% es agua subterránea, un 0.002% conforma los ríos y lagos superficiales, y un 0.001% está presente en forma de vapor de agua.

Una de las causas más importantes de la contaminación de los recursos naturales de agua superficial son las descargas de residuos domésticos e industriales que se realizan sobre estas aguas, lo que conlleva en muchos casos a dificultades y a un elevado coste en su potabilización [11, 12].

El ion cloruro está presente en el agua de consumo procedente de fuentes naturales, aguas residuales, vertidos industriales e intrusiones salinas, en concentraciones que varían desde unas pocas partes por millón (ppm) hasta varios gramos por litro.

La calidad del agua potable se evalúa mediante análisis físico-químicos, biológicos, organolépticos y radiológicos. Sólo se puede beber agua si la concentración de muchos de sus componentes está dentro de los límites establecidos por reglamentos especiales teniendo en cuenta la ingesta diaria máxima, la naturaleza del agente contaminante y su posible grado de toxicidad [12].

Los consumidores evalúan la calidad del agua de consumo basándose principalmente en sus sentidos. Los componentes microbianos, químicos y físicos del agua pueden afectar a su aspecto, olor o sabor y el consumidor evaluará su calidad y aceptabilidad basándose en estos criterios. Aunque es posible que estas sustancias no produzcan ningún efecto directo sobre la salud, los consumidores pueden considerar que el agua muy turbia, con mucho color, o que tiene un sabor u olor desagradable es insalubre y rechazarla. Es, por consiguiente, sensato conocer las percepciones del consumidor y tener en cuenta, además de los valores de referencia relacionados con efectos sobre la salud, criterios estéticos al evaluar sistemas de abastecimiento de agua de consumo y al elaborar reglamentos y normas. Los cambios en el aspecto, olor y sabor del agua de consumo de un sistema de abastecimiento con respecto a sus características organolépticas normales pueden señalar cambios en la calidad del agua bruta o cruda (sin tratar) de la fuente o deficiencias en las operaciones de tratamiento, y deben investigarse.

El ion cloruro se considera un contaminante organoléptico ya que las altas concentraciones de este ion confieren un sabor salado al agua y a las bebidas. Hay diversos umbrales gustativos para el anión cloruro en función del catión asociado: los correspondientes al cloruro sódico, potásico y cálcico están en el intervalo de 200 a 300 mg/L. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y según el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, la máxima concentración permisible de cloruros en el agua potable es de 250 ppm. Este valor se estableció por razones de sabor. No se propone ningún valor de referencia basado en efectos sobre la salud para el cloruro en el agua de consumo, ya que la fuente principal de exposición de las personas al cloruro es la adición de sal a los alimentos, y la ingesta procedente de esta fuente generalmente excede en gran medida a la del agua de consumo [11, 13, 14].

3.1.2.-El cloruro en aguas salinas

La composición de las aguas salinas, medio natural en el que se desarrolla una fuente importante de nuestra dieta alimentaria, también ha sido objeto de gran atención por su vinculación con ésta. En el caso del agua del mar, los iones que aportan la salinidad al agua tienen dos orígenes. Los arrastrados por el agua que llegan desde los continentes, y los que traen los magmas que surgen en las dorsales oceánicas. El contenido de sal, es decir, la cantidad de sustancia inorgánica en solución, se denomina salinidad y se expresa en g/kg de agua de mar o partes por mil, con sodio, magnesio, calcio y potasio como cationes predominantes y cloruro, sulfato,

bromuro e hidrógeno carbonato como aniones predominantes. Dado que la composición química del agua de mar en una misma zona permanece constante, la medida de un solo constituyente químico es suficiente para determinar el contenido en sal. Por lo tanto, la salinidad se determina normalmente midiendo el contenido de cloruro dado que es el anión más abundante en agua de mar [15]. Hay lugares en los que la salinidad es distinta, por ejemplo, es más alta en el Mediterráneo y más baja en el Báltico, pero siempre se mantiene una proporción similar entre los iones, aunque las cantidades absolutas sean diferentes. La salinidad es, de hecho, una importante barrera que condiciona la distribución ecológica de los organismos acuáticos [16], es decir influye directamente en el funcionamiento de los organismos que viven en ellos.

La cantidad de sales disueltas que contiene el agua de mar es muy parecida a la que contienen los fluidos orgánicos de los seres del reino animal, por lo que también se produce el intercambio osmótico de sales entre ambos medios separados por membranas y tejidos semipermeables que permiten el paso de dichas sales. Los seres vivos que habitan en el océano deben poseer la misma cantidad de sales en su organismo que en el medio acuático, ya que, si no se mantiene constante, las células del animal se destruirían.

De acuerdo con este hecho, existen dos tipos de animales marinos:

- Eurihalinos: son aquellos que resisten perfectamente los cambios de salinidad porque están provistos de los mecanismos necesarios para regular la concentración de sales en su cuerpo según las características del medio en el

que se encuentren. Estos organismos viven en las zonas de mezcla de agua dulce con agua salada, como son los estuarios, zonas marinas próximas a las desembocaduras de los ríos, o en aquellos lugares donde la salinidad de las aguas alcanza valores muy variados.

- Estenohalinos: son aquellos animales marinos que carecen de mecanismos de regulación, por lo que no pueden acomodarse a cambios de salinidad del medio. La mayoría de este tipo de animales habita normalmente en las zonas alejadas de la costa y de los lugares de mezcla con aguas dulces.

El carácter de eurihalinidad o de estenohalinidad está relacionado con la migración de las especies, ya sea porque la salinidad del lugar cambie, obligándole a buscar aguas nuevas o bien porque, sin que el agua cambie, sea su sangre la que varíe su concentración de sales, y por ello debe emigrar y buscar el medio adecuado [17].

3.1.3.-El cloruro en líquidos biológicos

Los cationes y aniones inorgánicos juegan un papel muy importante en la composición de los fluidos del cuerpo humano. La detección de cualquier desviación de los rangos de concentración normales de estas especies es muy útil en el diagnóstico de enfermedades como la diabetes, la disfunción hepática y renal, así como las relacionadas con problemas cardíacos. Por lo tanto, el análisis de iones como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro se lleva a cabo rutinariamente en muchos hospitales en muestras de suero sanguíneo y orina de pacientes afectados por

distintos tipos de problemas. En estos casos, la determinación precisa de estos iones inorgánicos es clave para controlar la evolución de la enfermedad [18].

El ion cloruro es el electrolito que más predomina en fluidos extracelulares y el segundo más importante en la tonicidad plasmática. Sin embargo, la atención recibida a la determinación de cloruro en enfermos es muy limitada, mucho menos que para otros electrolitos. Su función es muy importante en muchos procesos biológicos como la regulación del pH, el mantenimiento del volumen intracelular y el crecimiento celular. Algunas de las muchas afecciones patológicas que están relacionadas con el cloruro son alteraciones ácido-base, elevada presión arterial y la fibrosis quística [19]. La determinación selectiva de cloruro en sistemas biológicos es muy importante para el diagnóstico de dichas enfermedades [20, 21].

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad crónica y hereditaria que se detecta por cantidades altas de cloruro en el organismo, en la cual el gen que codifica la proteína CFTR presenta una mutación que ocasiona un transporte irregular de los iones sodio, bicarbonato y cloruro a través de las membranas celulares afectando a múltiples órganos. Esta enfermedad afecta a más de 70.000 personas en todo el mundo ocasionando infecciones pulmonares muy graves, insuficiencia pancreática y complicaciones gastrointestinales, pudiendo llegar a ser mortal [22, 23]. De hecho, se estima que reduce la esperanza de vida hasta 30-40 años. La mortalidad de los niños que nacen con fibrosis quística es elevada, uno de cada dos muere dentro del primer año si no se detecta a tiempo, por lo que su diagnóstico precoz es esencial.

El sudor es un fluido biológico producido por glándulas localizadas en la epidermis. Este fluido ligeramente ácido (rango de pH 4.0-6.8), es un medio complejo y está compuesto principalmente por agua (99%), además de electrolitos (cloruros de sodio y potasio), urea, piruvato y lactato; proteínas, péptidos, aminas, aminoácidos e iones metálicos en concentraciones más pequeñas. Estas sustancias se almacenan en las glándulas sudoríparas, segregadas en el sudor, y finalmente se transportan a la superficie de la epidermis con reabsorción selectiva parcial de sodio y cloruro durante el transporte. Las enfermedades pueden cambiar la composición del sudor ya sea alterando la concentración de sus componentes o apareciendo otros que pueden actuar como biomarcadores de una enfermedad dada [24].

Hay una estrecha relación entre el aumento de la concentración de cloruro y de sodio en el sudor con la presencia de CF. Valores inferiores a 40 mM de concentración de cloruro en el sudor se definen como normales, mientras que los valores superiores a 60 mM son indicativos de que se padece dicha enfermedad. En el rango 40 a 60 mM, existe un riesgo de CF a considerar [25].

El correcto funcionamiento celular requiere mantener la concentración de H^+ del líquido extracelular entre unos valores determinados. El pH compatible con la vida debe estar en torno a 6.80-7.80. Los seres vivos han desarrollado diversos sistemas para conseguirlo, para ello los principales amortiguadores fisiológicos son el carbónico/bicarbonato, el fosfato, las proteínas y la hemoglobina además de los pulmones y los riñones que participan de manera fundamental en la regulación del equilibrio ácido-base mediante sus acciones compensadoras. Dado que los procesos metabólicos generan gran cantidad de ácidos, el organismo necesita neutralizar y

eliminar los H⁺ para mantener constante el pH. El ion cloruro juega un papel muy importante en el equilibrio ácido-base ya que neutraliza el pH y controla el volumen en fluidos extracelulares [26–28], por lo que las alteraciones ácido-base están muy relacionadas con el aumento de cloruro (hipercloremia) o descenso de la concentración de cloruro (hipocloremia) en el líquido extracelular. Las principales enfermedades relacionadas con estas alteraciones ácido-base del organismo son: la acidosis metabólica, la acidosis respiratoria, la alcalosis metabólica y la alcalosis respiratoria. Tanto en la acidosis metabólica como en la acidosis respiratoria, tiene lugar un descenso de pH en la sangre por debajo de los valores de referencia; y en la alcalosis metabólica y respiratoria se produce una elevación del pH. Todas estas disfunciones afectan considerablemente al correcto funcionamiento del cuerpo humano [29, 30].

La hipertensión es una de las enfermedades crónicas más comunes, es la principal causa de accidente cerebrovascular, insuficiencia cardiaca, ictus e insuficiencia renal. Se estima que afecta a más del 20% de los adultos en la mayoría de las sociedades modernas.

Diversos estudios muestran que la hipertensión está relacionada con la edad, menos del 10% que la padecen se encuentran en edades comprendidas de entre los 18–39 años y más del 60% tienen edades superiores a los 60 años. Los estudios más recientes revelan que el sufrimiento de esta enfermedad es equivalente tanto para los hombres como para las mujeres. Las principales causas de esta enfermedad son la obesidad y la ingestión de sal en la dieta [30, 31].

En la comida hay dos posibles fuentes de cloruro, una es el contenido natural y otra es la añadida en forma de cloruro de sodio, la más común, y menos extendida como el cloruro de potasio [32]. El principal efecto adverso del aumento de la ingesta de cloruro de sodio es una presión arterial elevada, que se ha demostrado ser uno de los factores de riesgo relacionados con las enfermedades cardiovasculares y renales [33].

La ingesta actual de sal en muchos países es de entre 9 y 12 g/día, lo que corresponde a un consumo elevado de sal. Una reducción de la ingesta de sal al nivel recomendado de 5-6 g/día, disminuiría la presión arterial tanto en individuos hipertensos como en normotensos. Estudios prospectivos y ensayos realizados han demostrado que una reducción adicional a 3-4 g/día de ingesta de sal, se asocia con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares por lo que reduciría las muertes. Por esta causa, un consumo de sal elevado agrava la retención de agua en los pacientes de enfermedades cardiovasculares provocando una progresión de la enfermedad [31, 34, 35].

El tratamiento farmacológico para controlar la presión arterial acompañándolo con dietas bajas en sodio y altas en potasio, restauran la presión arterial normal en más de la mitad de los pacientes hipertensos y disminuye el riesgo de muerte. Hoy en día, la principal preocupación es la mejora de la nutrición y el tratamiento farmacológico para prevenir las muertes cardiovasculares relacionadas con la hipertensión [36].

3.2 Métodos de análisis para la determinación de cloruro

El interés por la determinación de cloruro existe desde tiempos remotos y se encuentran muchos métodos descritos en bibliografía para su cuantificación, utilizando distintos principios y técnicas que han ido aumentando progresivamente la calidad de las determinaciones.

Debido al amplio rango de aplicaciones, y a la necesidad de llevar a cabo determinaciones de este ion en matrices de cierta complejidad, la necesidad de poner a punto nuevos métodos que permitan realizar cuantificaciones de este ion de forma simple y económica sin renunciar a la selectividad y sensibilidad, sigue siendo un reto de interés en química analítica [3].

Los métodos más antiguos para la detección y cuantificación de cloruros son los métodos volumétricos. El método argentométrico o método de Mohr se utiliza en el análisis de cloruros en aguas [37–39] según la norma UNE ISO 9297:2013. Otro método muy empleado es el método de Volhard que también se aplica a determinación de cloruros en aguas [40], y en diversos alimentos como la leche [41–43]. Otros métodos volumétricos utilizados para este tipo de determinaciones son las volumetrías mercurimétricas usadas también para el análisis de cloruro en agua [44] y para la determinación de cloruro en muestras de café [45].

Los métodos volumétricos mencionados anteriormente se han realizado frecuentemente con detección fotométrica en análisis de cloruros en aguas [46, 47]. Los métodos volumétricos poseen una alta precisión por lo que se utilizan

ampliamente en la industria química y la industria farmacéutica. Sin embargo, estos análisis son particularmente tediosos cuando la velocidad de la reacción implicada en la valoración es lenta, incluso cuando se usa un valorador automático. Un enfoque prometedor para lograr un rendimiento más rápido para los análisis requeridos en diversos campos, es el acoplamiento de técnicas de flujo a estas técnicas volumétricas [48].

Las técnicas de inyección de flujo (FIA) con detección espectrofotométrica, se han aplicado al análisis de cloruros en muchos tipos de aguas según la norma UNE EN ISO 15682: 2002 [49-55]. Una de las principales ventajas que presentan estos sistemas es la velocidad con que se realizan los análisis ya que suele ser significativamente más alta que cuando se utilizan dispositivos manuales, pero también presentan desventajas como menor versatilidad que los sistemas no automáticos y la inversión inicial suele ser elevada.

La determinación de cloruros en aguas se ha llevado a cabo también por medio de cromatografía iónica en fase líquida (IC). Esta técnica es cada vez más popular para el análisis de muestras ambientales debido a su alta precisión y fiabilidad [56], según las normas UNE EN ISO 10304-1:2009 y UNE EN ISO 10304-4:1999. La IC es un tipo de cromatografía que permite la separación de iones y moléculas polares basándose en las propiedades de carga de las moléculas. Se usa ampliamente en el análisis de cloruros en cualquier tipo de aguas tanto en aguas potables como embotelladas y residuales [57-61], y también en el agua de mar o aguas con salinidad elevada [62, 63]. Igualmente se ha utilizado para la

determinación de cloruros en cafés y tés [64], carnes [65], así como en muestras de naturaleza biológicas como lágrimas y suero sanguíneo [66, 67].

La electroforesis capilar es una técnica que emplea capilares de diámetro estrecho para realizar separaciones de alta eficiencia de moléculas grandes y pequeñas. Estas separaciones son facilitadas por el uso de altas tensiones, que generan flujos electroosmóticos y electroforéticos de disoluciones tampón y especies iónicas dentro del capilar, por lo que permite la separación de iones inorgánicos, ácidos y bases orgánicos, así como biomoléculas disueltas en una disolución tampón. La electroforesis capilar se ha aplicado para el análisis de cloruro con detección ultravioleta en aguas [68-70], en suero sanguíneo y orina [68, 71]; y con detección conductimétrica para la determinación de cloruros en muestras de agua potable, superficiales [72], agua de lluvia [72-74] y en medios biológicos como sangre y orina [18].

En cuanto al análisis de cloruro en sudor para el diagnóstico de CF, se han utilizado un amplio abanico de técnicas analíticas con distinto grado de éxito. Se han empleado técnicas como la IC/HPLC [75] y HPLC [76]. También se han llevado a cabo determinaciones a partir de la osmolaridad del sudor [77] o de mediciones conductimétricas [78]. En general, la aplicación de estos métodos requiere tiempos de análisis muy largos y la preparación de las muestras es tediosa.

Estas técnicas empleadas para el diagnóstico de la CF, tienen en común la manera de recoger el sudor, que consiste en estimular las glándulas sudoríparas del antebrazo con una sustancia llamada pilocarpina y el paso de una corriente eléctrica

débil (iontoforesis). En primer lugar, se limpia con agua destilada la piel del brazo, se colocan electrodos de cobre sobre la piel empapados en disolución de nitrato de pilocarpina (electrodo positivo), y de ácido sulfúrico 0.004 N (electrodo negativo) y se aplica una corriente de 2 a 5 mA durante 5 minutos. A continuación, la piel se vuelve a limpiar con agua destilada para la colocación de un papel de filtro de 4 cm de diámetro cubierto con plástico y cinta adhesiva. Después de 30-60 minutos, el papel se retira usando pinzas. Es una técnica compleja que requiere varios pasos para la recogida y análisis de muestras de sudor, se necesita un gran volumen de muestra, y además, es muy sencillo cometer errores en el procedimiento si la prueba no es realizada por profesionales experimentados en la recolección y análisis de sudor [79].

Como se ha mencionado, los métodos de análisis para la determinación de cloruro descritos anteriormente presentan algunas desventajas. En general los tiempos de análisis son largos, algunos de ellos implican la utilización de técnicas muy costosas, y en muchos casos, la muestra necesita un pretratamiento. Además, muchas de estas técnicas no se adecúan a las competencias y limitaciones financieras de las industrias y requieren una formación específica para su manejo e interpretación de los resultados. En este marco, las técnicas electroquímicas se presentan como una interesante opción a considerar para minimizar los inconvenientes, comentados anteriormente, ocasionados frecuentemente en el análisis del ion cloruro.

3.3 Técnicas electroquímicas

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, las técnicas electroquímicas pueden ser una buena alternativa para la determinación de iones cloruro minimizando algunos problemas inherentes a otros métodos y técnicas. En este sentido, estas técnicas se plantean como un escenario adecuado para el análisis de cloruros en diferentes matrices por su sencillez y bajo coste, además de sus conocidas ventajas en cuanto a la sensibilidad y selectividad.

A continuación, se describen someramente los fundamentos de las técnicas electroquímicas utilizadas en este trabajo.

3.3.1 Potenciometría

Los métodos potenciométricos de análisis se basan en la medida del potencial de celdas electroquímicas sin flujo de corriente neta. Durante casi un siglo, la potenciometría se ha usado en la identificación del punto final de valoraciones. En los métodos más recientes, las concentraciones iónicas se miden directamente a partir del potencial de electrodos de membrana selectivos de iones. Estos electrodos están relativamente libres de interferencias y constituyen una forma rápida, apropiada y no destructiva de determinación cuantitativa de numerosos aniones y cationes de importancia, como es el caso del cloruro [80]. En este sentido, se han desarrollado diversos tipos de electrodos de membrana cuyo potencial es selectivo hacia uno o varios iones dados.

Los electrodos selectivos de iones responden de forma lineal al logaritmo de la actividad del analito a lo largo de cuatro o seis órdenes de magnitud de actividad. Con este método apenas se contamina la muestra y el tiempo de respuesta es sólo de unos segundos o minutos, de forma que se puede utilizar para controlar corrientes o fluidos en aplicaciones industriales. Los electrodos responden a la actividad del ion del analito no complejado. Por tanto, no debe haber presentes ligandos o se les debe enmascarar. Puesto que normalmente se desea conocer la concentración no la actividad, se usan a menudo sales para llevar a todos los patrones y muestras a una fuerza iónica alta y constante. Si los coeficientes de actividad permanecen constantes, el potencial del electrodo está relacionado directamente con la concentración [81].

Numerosos ISEs para la detección de iones cloruro han sido descritos en bibliografía. Existen tres componentes importantes en un ISE: el elemento transductor, el material de membrana que separa el elemento transductor y la disolución acuosa, y la molécula receptora (ionóforo). La naturaleza del ionóforo es clave para determinar en última instancia la selectividad del ISE.

Se ha dedicado un esfuerzo considerable al desarrollo de membranas sólidas que sean selectivas para aniones de la misma forma que algunos vidrios responden a los cationes. Se trata de membranas con sitios catiónicos que responden selectivamente frente a los aniones. Así se han empleado con éxito membranas preparadas a partir de pequeñas esferas fundidas de haluros de plata en electrodos para la determinación selectiva de los iones cloruro, bromuro y yoduro [80].

3.3.2 Técnicas de barrido de potencial

En los métodos de barrido potencial, la corriente se registra a la vez que el potencial del electrodo cambia linealmente con el tiempo entre dos valores elegidos. El potencial inicial, E_1 , es normalmente aquel donde no hay actividad electroquímica y el potencial final, E_2 , es aquel en el que la reacción es controlada por el transporte de masas. En voltamperometría de barrido lineal, la exploración se detiene en E_2 , mientras que en voltamperometría cíclica, la dirección de barrido se invierte cuando el potencial alcanza E_2 y el potencial vuelve a E_1 [82].

La voltamperometría cíclica (CV) es la técnica más utilizada para la adquisición de información cualitativa sobre las reacciones electroquímicas. Esta técnica se caracteriza por su capacidad en proporcionar rápidamente información considerable sobre la termodinámica de los procesos redox, la cinética de las reacciones heterogéneas de transferencia de electrones, además de sobre las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción [83].

La CV suele ser la primera técnica utilizada en un experimento que aborde un estudio electroanalítico, ya que ofrece una localización rápida de los potenciales redox de las especies electroactivas y evalúa el efecto del medio en el que tiene lugar el proceso redox.

La CV consiste en escanear linealmente el potencial del electrodo de trabajo (en una solución no agitada), usando una forma de onda de potencial triangular. Pueden realizarse uno o múltiples ciclos dependiendo de la información que se quiera obtener. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente

resultante del potencial aplicado. El gráfico resultante se denomina voltamperograma cíclico que es dependiente del tiempo y de un gran número de parámetros físicos y químicos. Los picos característicos en el voltamperograma cíclico son causados por la formación de la capa de difusión cerca de la superficie del electrodo [84].

Las técnicas voltamperométricas de impulsos fueron introducidas por Barker y Jenkin para disminuir los límites de detección en medidas voltamperométricas. Para ello, se aumentó sustancialmente la relación entre las corrientes faradaica y no faradaica.

La voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) es una técnica extremadamente útil para medir trazas de especies orgánicas e inorgánicas. En esta técnica electroquímica, se aplican al electrodo de trabajo impulsos de potencial de magnitud fija y de pocos milisegundos de duración superpuestos sobre una rampa de potencial lineal a intervalos regulares de tiempo. La corriente se muestrea dos veces, justo antes de la aplicación del impulso y de nuevo después de que el potencial se ha mantenido constante durante un tiempo suficientemente largo, normalmente 40 ms. Esta diferencia de corriente se representa en función del potencial aplicado.

El resultado es un voltamperograma diferencial de impulsos que consiste en picos cuya altura (intensidad de corriente), es directamente proporcional a la concentración del analito, caracterizándose por una excelente supresión de la corriente de fondo originando señales analíticas bien definidas, que proporcionan información cuantitativa mejorada [83, 84].

3.4 Sensores electroquímicos serigrafiados

Hoy en día, el desarrollo de sensores químicos se presenta como una de las áreas más activas de la química analítica y entre los sensores químicos, los electroquímicos, en los que el elemento transductor basa su respuesta en la medida de una propiedad eléctrica generada en una celda electroquímica.

El creciente uso de sensores electroquímicos en muchas áreas de análisis ha requerido una mejora en las carencias que los electrodos convencionales utilizados en estas técnicas presentaban, como por ejemplo la mala reproducibilidad, o las tediosas tareas de limpieza y recuperación que precisan tras su uso. En este sentido, el carácter desechable de los electrodos serigrafiados evitan estos inconvenientes.

Desde mediados de 1980, la tecnología serigráfica ha dado lugar a una producción en masa de dispositivos miniaturizados debido a la facilidad con la que estos sensores se pueden fabricar a escala industrial, a su bajo coste, robustez y carácter desechable, así como a su atractivo electroanalítico. Los sistemas electródicos serigrafiados constan habitualmente de tres electrodos, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. La utilización de sistemas serigrafiados de tres electrodos permite el desarrollo de sensores desechables de gran utilidad para muchas aplicaciones.

Este tipo de dispositivos se caracterizan por proporcionar una gran flexibilidad en el diseño del electrodo en cuanto a su distribución espacial, forma y área; son desechables, por lo que se eliminan tareas de limpieza; presentan mayor reproducibilidad; disponen de una amplia gama de materiales para su fabricación;

bajo coste en su producción; son viables para la realización de análisis “in situ” y son susceptibles de numerosas modificaciones [2, 85].

En general, en la fabricación de este tipo de dispositivos se usan pastas o tintas que se pueden dividir en conductoras y aislantes [86]. Las pastas conductoras están hechas de una base de resina (epoxi, alquílica, acrílica, poliuretánica o fenólica) disuelta en un disolvente orgánico (alcohol, acetona, etc.) en la que se dispersa el material conductor que puede ser, por ejemplo, Ag/AgCl en el caso de los electrodos de referencia, o polvo de grafito, oro, platino, etc., para los electrodos de trabajo y contraelectrodos. Por otro lado, las tintas dieléctricas que forman la parte aislante del sensor están hechas de material polimérico o cerámico. Las distintas tintas que definen las partes funcionales del sensor se depositan secuencialmente sobre un sustrato o material soporte con la ayuda de unas pantallas o moldes que llevan definidos los motivos a imprimir. El sustrato debe de ser inerte y de bajo coste, puesto que el objetivo es la obtención de dispositivos desechables. Algunos materiales utilizados con este propósito son PVC, policarbonato, nitrocelulosa, materiales cerámicos o fibra de vidrio, y más recientemente textiles.

El electrodo está listo para su uso después de pasar el proceso de curado de las tintas, que se lleva a cabo a temperatura ambiente, por radiación ultravioleta o por curado térmico. En el curado térmico, debe controlarse cuidadosamente la resistencia térmica del material que se utiliza como sustrato. El curado por radiación ultravioleta es bastante rápido, normalmente solo dura unos segundos [87].

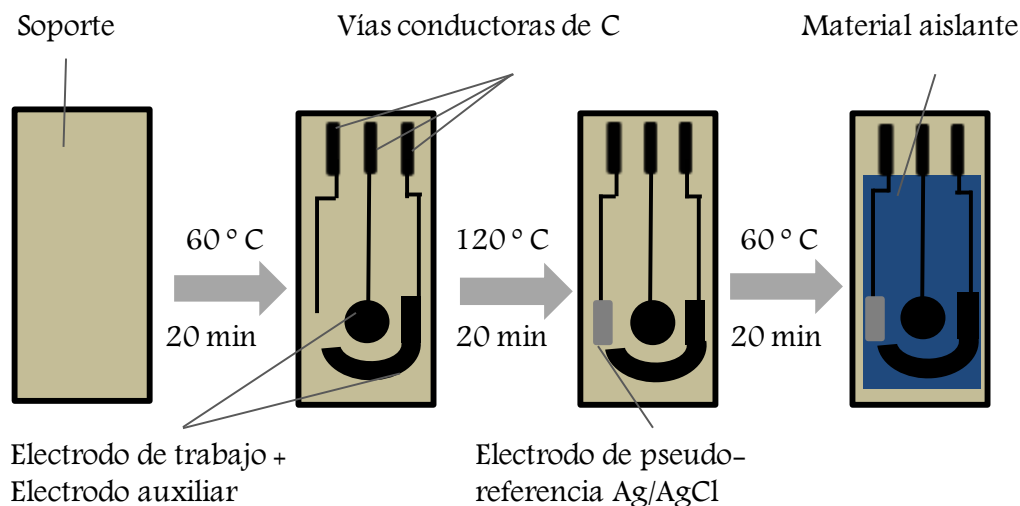


Figura 3.1: Esquema de la fabricación de los sensores serigrafados utilizados.

La versatilidad de estas técnicas de fabricación permite la realización de diferentes geometrías de electrodos que pueden ser diseñadas para satisfacer requisitos específicos, además de la amplia gama de formas en que los electrodos pueden ser modificados. La composición de las tintas de impresión permite su alteración mediante la adición de sustancias muy diferentes, tales como metales, enzimas, polímeros, agentes complejantes, etc. Otra variable en estos electrodos desechables es el propio sustrato [2, 88]. Actualmente, se están utilizando sustratos flexibles y textiles en el análisis electroquímico, que está dando lugar a importantes avances en el campo de los sensores electroquímicos por su potencial interés para el desarrollo de los llamados tejidos inteligentes, base de las novedosas prendas inteligentes.

3.4.1 *Electrodos serigrafiados “wearables”*

Se denominan electrodos serigrafiados vestibles, aquéllos cuyo sustrato es un material flexible, textil, y que, por tanto, pueden ser explotados para distintas aplicaciones prácticas.

Son especialmente adecuados para el desarrollo de sensores destinados a estar en contacto con el cuerpo humano para monitorizar algún parámetro de interés donde la durabilidad, la resistencia a las deformaciones y un peso ligero son requisitos fundamentales [1].

El importante desafío para este avance no es sólo su fabricación, sino la estabilidad de estos dispositivos en términos de propiedades eléctricas, resistencia a la deformación y torsión o propiedades electroquímicas [89]. La adaptación del proceso de serigrafía para la preparación de sensores electroquímicos textiles requiere un conocimiento detallado de la influencia de las condiciones de fabricación y propiedades del sustrato en la funcionalidad de los dispositivos resultantes, es decir, el sustrato textil debe ser compatible con el proceso de impresión y con el medio operativo específico.

Los diferentes tejidos utilizados para estos sensores pueden ser naturales, como la lana y el algodón, o sintéticos, como el poliéster, el nylon y otros polímeros. Cada uno de ellos posee diferentes estructuras y propiedades físicas y químicas. El tejido óptimo utilizado para sensores electroquímicos textiles debe poseer propiedades inertes, mantener un funcionamiento estable durante largos períodos de

tiempo bajo condiciones normales y bajo un fuerte desgaste, ser resistente al agua para medidas en fase líquida, ser hidrofóbico y no adsorber la humedad [1].

Este tipo de sensores han sido desarrollados sobre todo en esta última década, adquiriendo mucha importancia en aplicaciones biomédicas para la medida de distintos parámetros como el ritmo del corazón y la respiración, la oxigenación de la sangre, la temperatura de la piel, la actividad del cerebro, la presión sanguínea, etc. [1]. Además, el interés médico por sistemas portátiles surge de la necesidad de controlar a pacientes durante largos periodos de tiempo. Estos dispositivos pueden recopilar continuamente información de determinados parámetros de interés de una persona y proporcionar esta información a ellos mismos o a su médico en el momento oportuno. Esta supervisión continua puede alertar al usuario de cualquier peligro inminente para la salud y, por lo tanto, actuar en consecuencia [90, 91]. También, el diagnóstico y pronóstico del esfuerzo físico y la fatiga del usuario es muy útil en el campo deportivo. Otra aplicación que genera gran interés es la identificación de peligros o amenazas externas para la salud, la seguridad o el medioambiente, por lo que también hay una gran demanda para detectar por ejemplo, compuestos explosivos, contaminantes, etc., de manera sensible, rápida, simple y fiable [92].

3.4.2. Electrodo serigrafado modificado con nanopartículas

El uso de nanomateriales presenta una amplia gama de aplicaciones en diferentes campos como la química, la física, la medicina, la óptica y las ciencias de los materiales. Estos materiales son de gran interés científico debido a sus interesantes

propiedades físico-químicas, eléctricas y catalíticas, determinadas principalmente por su tamaño, composición y estructura.

Como consecuencia de sus propiedades, se han empleado nanomateriales para diversos fines en química analítica. El uso de nanopartículas (NPs) en electroanálisis, es un área de investigación que está creciendo continuamente en relación a su síntesis, caracterización y aplicación. En las últimas décadas se están desarrollando electrodos modificados con este tipo de materiales, dando lugar a una mayor sensibilidad y selectividad en las determinaciones ya que presentan una mayor área superficial, produciendo así mejores interacciones con el analito estudiado. Su actividad catalítica y sus propiedades ópticas únicas hacen que los nanomateriales sean ideales para aplicaciones electroanalíticas [93, 94].

Los metales más utilizados en la síntesis de NPs para la modificación de SPEs son el oro, la plata y el platino, aunque también hay trabajos descritos con nanopartículas de otros materiales como el hierro, paladio, níquel, cobre, rutenio, iridio, etc. Se han utilizado varias técnicas para su síntesis, pero se ha comprobado que mediante la electrodeposición se obtienen NPs con características más controladas. La electrodeposición o deposición electroquímica consiste en la reducción de una sal metálica sobre la superficie electródica aplicando una corriente eléctrica, un potencial constante o un barrido de potencial [95]. Su principal ventaja es la unión directa de las nanopartículas sobre el electrodo de trabajo, además de ser simple, rápido y económico [96].

Las NPs de metales como la plata, han ganado cada vez más atención debido a sus propiedades físicas y químicas distintivas, así como a sus exitosas aplicaciones. Las nanopartículas de plata presentan interesantes propiedades mecánicas y biológicas, tienen actividad catalítica; además de conductividad térmica y eléctrica. Una de sus propiedades a destacar es su actividad antimicrobiana y antibacteriana por lo que son ideales para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas [97].

3.5 Métodos electroanalíticos para la determinación de cloruro

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, uno de los principales retos de hoy en día, es el desarrollo de métodos que respondan a la creciente necesidad de realizar análisis rápidos "in situ". Estos métodos deben ser sensibles y precisos, y capaces de determinar diversas sustancias con diferentes propiedades en muestras de la "vida real". En los últimos años, muchos de los métodos desarrollados con este fin se han basado en el uso de técnicas electroquímicas debido a su alta sensibilidad, su adecuada selectividad y bajo coste [2, 98].

En este sentido, los iones haluro han sido objeto de análisis mediante técnicas electroquímicas en diversas matrices. En la bibliografía, se describen tres tipos de métodos: potenciométricos, voltamperométricos y coulombimétricos, para llevar a cabo la cuantificación de estos iones. La potenciometría es la técnica electroquímica más utilizada que implica la medida del potencial generado en una celda electroquímica en condiciones de equilibrio.

La potenciometría es una técnica que ha sido muy utilizada en la detección del punto final de análisis volumétrico de cloruros. Así, se han realizado titulaciones con detección potenciométrica para el análisis de cloruros en plantas [99] y en extractos de suelo [100]. Para ello se utilizó un electrodo selectivo de cloruro para detectar el punto final de la valoración de la mezcla de extracto de tejido de la planta con AgNO_3 , dando resultados casi idénticos a los obtenidos por el procedimiento de Mohr, pero más rápido, sencillo y preciso.

La detección potenciométrica también ha sido muy usada en análisis de inyección por flujo (FIA) debido a la simplicidad de construcción de estos dispositivos como detectores de análisis en flujo, así como su fácil miniaturización.

La detección potenciométrica utilizando electrodos selectivos de iones (ISEs), ha sido muy empleada aunque la selectividad de estos sensores no siempre es suficiente para el análisis de muestras reales en matrices complejas [101]. El FIA por detección potenciométrica se ha aplicado al análisis de cloruros en muchos tipos de aguas según la norma UNE EN ISO 15682: 2002 [102-108]. También se han usado para la detección del ion cloruro en vegetales [109], en alimentos [110], además de numerosas aplicaciones en el campo de la química clínica y bioanalítica [111].

Uno de los métodos de análisis más utilizados para la determinación de ion cloruro en agua son los ISEs según la norma UNE 77042:2002 de calidad del agua. Este tipo de sensores proporcionan una respuesta directa, rápida y una forma económica de realizar mediciones de iones. Son atractivos para aplicaciones prácticas debido a su operación simple, portabilidad y bajo consumo de energía.

Estos electrodos han demostrado ser útiles para la determinación cuantitativa de muchas especies aniónicas. Existen numerosos informes en bibliografía que han desarrollado ISEs para monitorizar cloruros además de otros aniones tales como fluoruro, fosfato, sulfato, nitrato, nitrito, cianuro, etc., así como otros cationes tales como amonio en muestras ambientales complejas como son lagos, ríos, agua de mar y suelos [112-119]. Las desventajas que presentan estos electrodos son límites de detección altos y baja selectividad en la monitorización de metales traza importantes ambientalmente, y de aniones en aguas naturales y suelos.

Para la determinación de un gran número de iones inorgánicos y orgánicos se han desarrollado ISEs basados en membranas poliméricas que contienen ionóforos neutros o cargados. Concretamente, se han puesto a punto sensores selectivos de cloruros usando como ionóforos la 2,5-dihidroxi-p-benzoquinona (DHBQ) [120] y un complejo polimérico de cobalto (II) con una base de Schiff [121], que ofrecen una buena selectividad en la determinación del ion cloruro en presencia de los cationes Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ; y los aniones CH_3COO^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} y Br^- . También se han usado como ionóforos algunos compuestos orgánicos de mercurio [122], bistiourea [123] y tris (b-dicetonatos) de lantánidos [124], que exhiben alta selectividad hacia los aniones cloruro en el intervalo de concentración de 10^{-5} M a 10^{-1} M con pendientes nernstianas.

Babu y colaboradores desarrollaron sensores de calix (4)areno [125], y además usaron receptores basados en tiourea/urea incorporados en calix [4] arenos 1,3-disustituidos [126] para la detección del cloruro. Gupta y colaboradores [127] pusieron a punto un ISE de cloruro basado en el uso de un anion como receptor, 2-

(1-H imidazol [4,5-f] [1,10] fenantrolina 2-il) 6-metoxifenol (HIPM) en policloruro de vinilo (PVC) [128].

Otra de las aplicaciones más importantes de los ISEs es el análisis clínico de electrolitos en fluidos biológicos (sangre, orina, suero), como son los iones sodio, potasio, calcio, magnesio, litio y cloruro. La utilización de este tipo de electrodos para la determinación de cloruro presenta una serie de inconvenientes debido a la existencia de interferencias que proporcionan una baja selectividad, por lo que, sin lugar a duda, se necesita mejorar este tipo de dispositivos para conseguir mejores resultados en el análisis de cloruros en muestras biológicas [129-138].

Como se ha mencionado anteriormente el análisis del ion cloruro en el sudor es muy relevante en el diagnóstico de la CF. La mayor parte de las determinaciones se llevan cabo por medio del llamado test del sudor. También se ha desarrollado un ISE para medir mediante potencimetría directa la cantidad de cloruro en el sudor [139], pero el test del sudor (Gibson-Cooke) es la prueba más discriminatoria para el diagnóstico de la CF [140]. Consiste en una titulación coulombimétrica para determinar la concentración de iones cloruro en muestras de sudor. La muestra se mezcla con una disolución tampón ácida/estabilizadora donde están sumergidos electrodos de plata que generan iones plata en el medio por electrólisis. La combinación de iones de plata y iones cloruro (procedentes de la muestra de sudor) es una reacción cuantitativa que se registra en tiempo real y es proporcional a la concentración de iones cloruro en la muestra de sudor.

El desarrollo de nuevos métodos de bajo coste, con facilidad de operación y que permitan la determinación in situ de cloruro en sudor, es muy importante para simplificar el análisis de CF dada la gravedad de la enfermedad y la importancia de un diagnóstico rápido.

En estos últimos años, la sustitución de los electrodos tradicionales por nuevos dispositivos miniaturizados desechables es una alternativa que presenta muchas ventajas para el análisis de cloruro en muestras biológicas y en muestras de distintos tipos de agua. Sin embargo, en bibliografía, no se han descrito muchos sensores miniaturizados para el análisis de cloruros en este tipo de muestras.

J.M Zen y colaboradores desarrollaron sistemas electródicos serigrafados (SPEs) formados por un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de Ag, y un electrodo de referencia de Ag/AgO_x, para la determinación voltamperométrica simultánea de cloruro, bromuro y yoduro en muestras biológicas, en agua de mar y en aguas estancadas. Los límites de detección obtenidos fueron de 18,83 μM, 2,95 μM y 3,05 μM para el cloruro, bromuro y yoduro respectivamente; y los rangos de calibración de 100 μM a 20 mM para el cloruro, y de 10 μM a 20 mM para el bromuro y yoduro. [141].

F.J. Muñoz y colaboradores, pusieron a punto SPEs desechables formados por un electrodo de trabajo y de referencia de Ag/AgCl capaces de determinar mediante potenciometría, la concentración del ion cloruro en el sudor para la detección temprana de la fibrosis quística. Para inducir el sudor usaron policarpina por lo que se midió directamente la cantidad de cloruro que había en la piel mediante

potenciometría. El problema de este método es que presenta errores de entorno a un 8% [25].

A. Cranny y colaboradores han puesto a punto SPEs para la detección potenciométrica de cloruros en muestras del medio ambiente. Fabricaron mediante tecnología serigráfica, electrodos de Ag/AgCl, preparando cinco formulaciones diferentes e investigaron las respuestas del cloruro con el tiempo.

La robustez mecánica y química de estos electrodos se demostró a través de su capacidad para detectar niveles variables de cloruro cuando se sumergen en el suelo. Esta capacidad en particular los convirtió en una valiosísima herramienta en los campos de la hidrología, la ciencia agrícola, la ciencia del suelo y la ciencia ambiental [5].

A. Cranny y colaboradores desarrollaron sensores de cloruro potenciométricos fabricados mediante la cloruración electroquímica de la superficie de electrodos de plata serigrafiados usando técnicas electroquímicas. La respuesta a los iones cloruro por cada tipo de muestra se determinó midiendo sus potenciales con respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl comercial en el intervalo de concentración de cloruro de 50 μM a 100 mM [4].

J. Wang y sus colaboradores han desarrollado un SPEs potenciométrico utilizando papel como sustrato, para el análisis de cloruro en distintos tipos de muestras de agua [142]. Esto electrodos fueron modificados con una película de polipirrol dopada con cloruro que se polimerizó mediante CV sobre la superficie del

electrodo. Con este dispositivo pueden detectarse selectivamente concentraciones de cloruro en el intervalo de 1 μM a 10 mM.

Una de las características más importantes de los SPEs es la gran versatilidad que presenta en cuanto a las diversas formas en que los electrodos pueden ser modificados. Para la cuantificación del ion cloruro, se han desarrollado sensores electroquímicos modificados con nanopartículas de plata (AgNPs-SPCEs).

Chiu y colaboradores, han puesto a punto SPEs modificados con AgNPs depositadas a partir de una disolución de AgNO_3 usando como tampón una disolución de Britton-Robinson a pH 1.8 y un potencial de 550 mV. Este dispositivo minituarizado fue aplicado para determinar cloruro amperométricamente en disoluciones acuosas [143].

Toh y colaboradores, desarrollaron SPEs para la detección voltamperométrica del ion cloruro en sudor sintético usando AgNPs que se depositan en el electrodo de trabajo para el diagnóstico de la CF. La señal obtenida se correlaciona linealmente con la concentración de iones cloruro en el rango de concentración de 2 mM a 40 mM. Se logró una cuantificación fiable de los niveles de ion cloruro en muestras de sudor sintético. La desventaja de este método es la tarea de síntesis de las AgNPs [22].

3.6 Espectroelectroquímica

La espectroelectroquímica es una técnica analítica que consiste en el acoplamiento de métodos ópticos y electroquímicos, se ha empleado desde principios

de los años ochenta para investigar una amplia variedad de sistemas redox inorgánicos, orgánicos y biológicos. Puede ser extremadamente útil para el conocimiento de mecanismos de reacción, y para la descripción de parámetros cinéticos y termodinámicos. Las técnicas electroquímicas se han acoplado a una diversidad de métodos ópticos. La principal ventaja de la espectroelectroquímica es la correlación de la información obtenida en las medidas electroquímicas y ópticas simultáneamente.

En este trabajo se ha utilizado la espectroelectroquímica UV/Vis de absorción por configuración en reflexión, en la cual, el haz de luz es reflejado por la superficie del electrodo.

Una de sus principales aplicaciones consiste en la medida de los cambios de absorción resultantes de las especies producidas o consumidas en el proceso redox. El cambio en la absorbancia está relacionado con la concentración y la longitud de la trayectoria óptica, por lo que la evaluación de la respuesta de absorbancia-tiempo durante la generación electroquímica o consumo de una especie ópticamente activa, puede proporcionar una visión extremadamente útil de los mecanismos de reacción y de su cinética. Tales experimentos son particularmente útiles cuando el reactivo y el producto tienen espectros diferentes [84, 144, 145].

También la espectroelectroquímica UV/Vis es una buena alternativa para obtener información sobre los electrodos modificados con nanopartículas. Se ha demostrado que dicha técnica proporciona información sobre las nanopartículas generados en la superficie del electrodo comparable a la obtenida por microscopía

electrónica de barrido. La información espectral se suministra in situ durante la electrodeposición de las nanopartículas en el electrodo, lo que nos permite conocer el tipo de nanopartículas depositadas en la superficie electródica, proporcionando un método analítico rápido y de bajo coste para asegurar que el electrodo ha sido modificado con éxito. Esta técnica híbrida es extremadamente útil en la electrosíntesis de nanopartículas de oro o plata, ya que tienen una banda plasmónica característica, cuya posición, anchura y forma están directamente relacionadas con el tipo de nanopartículas formadas. Las nanopartículas de plata poseen una banda plasmónica que se puede seguir espectroscópicamente durante la electrodeposición. Por lo tanto, la espectroelectroquímica es una técnica muy útil para estudiar procesos de electrodeposición [146].

3.7 Referencias

- [1] J.R. Windmiller, J. Wang, *Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review*, *Electroanalysis* 25(1) (2012) 29–46.
- [2] O. Domínguez, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez, *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, *Talanta* 73(2) (2007) 202–219.
- [3] R. Zhang, S. Xu, Y. Zhu, J. Luo, X. Liu, D. Tang, *One-pot facile preparation of Ag nanoparticles for chloride ion sensing*, *Colloid and Polymer Science* 294(10) (2016) 1643–1649.
- [4] A. Cranny, N. Harris, N. White, *Screen Printed Potentiometric Chloride Sensors*, *Procedia Engineering* 87 (2014) 220–223.

- [5] A. Cranny, N.R. Harris, M. Nie, J.A. Wharton, R.J.K. Wood, K.R. Stokes, Screen-printed potentiometric Ag/AgCl chloride sensors: Lifetime performance and their use in soil salt measurements, *Sensors and Actuators, A: Physical* 169(2) (2011) 288-294.
- [6] E. Ropelewska, P. Zapotoczny, A calorimetric assessment of the effects of sodium chloride and sodium bromide on the microbiological and thermokinetic characteristics of soil, *Geoderma* 288 (2017) 1-7.
- [7] A. Singh, Hydrological problems of water resources in irrigated agriculture: A management perspective, *Journal of Hydrology* 541, Part B (2016) 1430-1440.
- [8] M.F. Montemor, J.H. Alves, A.M. Simões, J.C.S. Fernandes, Z. Lourenço, A.J.S. Costa, A.J. Appleton, M.G.S. Ferreira, Multiprobe chloride sensor for in situ monitoring of reinforced concrete structures, *Cement and Concrete Composites* 28(3) (2006) 233-236.
- [9] U. Angst, B. Elsener, C.K. Larsen, Ø. Vennesland, Critical chloride content in reinforced concrete - A review, *Cement and Concrete Research* 39(12) (2009) 1122-1138.
- [10] M. Torres-Luque, E. Bastidas-Arteaga, F. Schoefs, M. Sánchez-Silva, J.F. Osmá, Non-destructive methods for measuring chloride ingress into concrete: State-of-the-art and future challenges, *Construction and Building Materials* 68(0) (2014) 68-81.
- [11] http://www.kpesic.com/sites/default/files/manual_de_agua_segura_0.pdf.
- [12] L. Petracchia, G. Liberati, S. Giuseppe Masciullo, M. Grassi, A. Fraioli, Water, mineral waters and health, *Clinical Nutrition* 25(3) (2006) 377-385.
- [13] O.M.S, Guías para la calidad del agua potable, Genève, (2006).
- [14] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- [15] C. Huber, T. Werner, C. Krause, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, Energy transfer-based lifetime sensing of chloride using a luminescent transition metal complex, *Analytica Chimica Acta* 364(1-3) (1998) 143-151.
- [16] A. Sánchez y Gándara, Conceptos básicos de gestión ambiental y desarrollo sustentable, Instituto Nacional de Ecología, México, (2011).

- [17] J.L. Cifuentes, P. Torres, M. Frías, *El océano y sus recursos IV. Las ciencias del mar: oceanografía biológica*, México, (1997).
- [18] Q.J. Wan, P. Kubáň, J. Tanyanyiwa, A. Rainelli, P.C. Hauser, Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Analytica Chimica Acta* 525(1) (2004) 11-16.
- [19] S.C. Jahn, L. Rowland-Faux, P.W. Stacpoole, M.O. James, Chloride concentrations in human hepatic cytosol and mitochondria are a function of age, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 459(3) (2015) 463-468.
- [20] F. Faridbod, M.R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, Developments in the field of conducting and non-conducting polymer based potentiometric membrane sensors for ions over the past decade, *Sensors* 8(4) (2008) 2331-2412.
- [21] F. Qu, N.B. Li, H.Q. Luo, Polyethyleneimine-Templated Ag Nanoclusters: A New Fluorescent and Colorimetric Platform for Sensitive and Selective Sensing Halide Ions and High Disturbance-Tolerant Recognitions of Iodide and Bromide in Coexistence with Chloride under Condition of High Ionic Strength, *Analytical Chemistry* 84(23) (2012) 10373-10379.
- [22] H.S. Toh, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R.G. Compton, Electrochemical detection of chloride levels in sweat using silver nanoparticles: A basis for the preliminary screening for cystic fibrosis, *Analyst* 138(15) (2013) 4292-4297.
- [23] S.J. Bowen, J. Hull, *The basic science of cystic fibrosis*, Paediatrics and Child Health United Kingdom, 25(4) (2015) 159-164.
- [24] A. Mena-Bravo, M.D. Luque de Castro, Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 90 (2014) 139-147.
- [25] J. Gonzalo-Ruiz, R. Mas, C. de Haro, E. Cabruja, R. Camero, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz, Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat, *Biosensors and Bioelectronics* 24(6) (2009) 1788-1791.

- [26] N.M. Yunos, R. Bellomo, D. Story, J. Kellum, Bench-to-bedside review: Chloride in critical illness, *Critical Care* 14(4) (2010).
- [27] A.P. Simopoulos, F.C. Bartter, The metabolic consequences of chloride deficiency, *Nutrition Reviews* 38(6) (1980) 201-205.
- [28] J.M. Prieto De Paula, S. Franco-Hidalgo, E. Mayor-Toranzo, J. Palomino-Doza, J.F. Prieto De Paula, Acid-base balance disorders, *Dialisis y Trasplante* 33(1) (2012) 25-34.
- [29] J.M. González, E. Arilla, M. Rodríguez, A. Sánchez, *Bioquímica clínica*, McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U., Madrid, (1998).
- [30] E. Lerma, M. Rosner, *Clinical Decisions in Nephrology, Hypertension and Kidney Transplantation*, Springer-Verlag New York (2013).
- [31] F.J. He, M. Burnier, G.A. MacGregor, Nutrition in cardiovascular disease: Salt in hypertension and heart failure, *European Heart Journal* 32(24) (2011) 3073-3080.
- [32] B.J. Sucman E., Determination of chlorides in foods using ion-selective electrodes: A review, *Canadian journal of analytical sciences and spectroscopy* 47 (2002) 5.
- [33] O.R. Fennema, *Química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, (2000).
- [34] M.A.H. Hendriksen, R.T. Hoogenveen, J. Hoekstra, J.M. Geleijnse, H.C. Boshuizen, J.M.A. Van Raaij, Potential effect of salt reduction in processed foods on health, *American Journal of Clinical Nutrition* 99(3) (2014) 446-453.
- [35] F.J. He, G.A. MacGregor, Salt and sugar: their effects on blood pressure, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 467(3) (2015) 577-586.
- [36] J.C. Hunt, Sodium intake and hypertension: A cause for concern, *Annals of Internal Medicine* 98(5_Part_2) (1983) 724-728.
- [37] M. Mohsin, M. Farooqui, S.D. Rathod, Determination of measurement uncertainty in the analysis of ground water chloride using Mohr's method, *Indian Journal of Environmental Protection* 30(6) (2010) 506-509.
- [38] F. Bitar, Determination of chloride ion concentration in drinking water of Al Hawash area, *Research Journal of Pharmacy and Technology* 9(6) (2016) 701-710.

- [39] J. Chen, G. Zhang, L. Mo, J. Liu, Z. He, Sea sand concrete chloride ion diffusion and combination of curing, *Applied Mechanics and Materials* 174-177 (2012) 358-361.
- [40] J. Shaw, R. Van Es, Measurement of chloride ion concentration of reinforced concrete, *Concrete (London)* 37(8) (2003) 40.
- [41] M.N. Haouet, M.S. Altissimi, M. Framboas, R. Galarini, Validation of the Volhard method for chloride determination in food, *Accreditation and Quality Assurance* 11(1-2) (2006) 23-28.
- [42] L.J. Poortvliet, W. Horwitz, B.M. Krol, E. Garcia Aragonés, J.A. Jans, H. Mair-Waldburg, R. van Renterghem, G. Steiger, Determination of chloride concentration in cheese: collaborative study, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 65(6) (1982) 1350-1356.
- [43] G. Nageswararao, H. Blobel, Determination of Chloride in Milk, *Journal of Dairy Science* 46(12) (1963) 1426-1428.
- [44] F.E. Clarke, Determination of chloride in water: Improved colorimetric and titrimetric methods, *Analytical Chemistry* 22(4) (1950) 553-555.
- [45] E.B. Silva, F.D. Nogueira, P.T.G. Guimarães, M.R. Malta, Chloride analysis methods and contents in leaves, grains, and husks of coffee, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29(15-16) (1998) 2319-2331.
- [46] D.M. Zall, D. Fisher, M.Q. Garner, Photometric determination of chlorides in water, *Analytical Chemistry* 28(11) (1956) 1665-1668.
- [47] M. Heng, M. Kita, K. Murata, Quantitative analysis of chloride in brackish water: An application to the hyperchromic effect of copper(II) ion with chloride ion, *Analytical Sciences* 21(2) (2005) 95-99.
- [48] H. Ohura, T. Imato, Rapid and automated analytical methods for redox species based on potentiometric flow injection analysis using potential buffers, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* 2011 (2011).

- [49] M. Cheregi, A.F. Danet, Flow injection determination of chloride ions with spectrophotometric detection, *Analytical Letters* 30(15) (1997) 2847–2858.
- [50] J.F. Van Staden, S.I. Tlowana, Spectrophotometric determination of chloride in mineral and drinking waters using sequential injection analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 371(3) (2001) 396–399.
- [51] R.B.R. Mesquita, S.M.V. Fernandes, A.O.S.S. Rangel, Turbidimetric determination of chloride in different types of water using a single sequential injection analysis system, *Journal of Environmental Monitoring* 4(3) (2002) 458–461.
- [52] J. Cirello-Egamino, I.D. Brindle, Determination of chloride ions by reaction with mercury thiocyanate in the absence of iron(III) using a UV-photometric, flow injection method, *The Analyst* 120(1) (1995) 183–186.
- [53] C.R. Silva, H.J. Vieira, L.S. Canaes, J.A. Nóbrega, O. Fatibello-Filho, Flow injection spectrophotometric method for chloride determination in natural waters using Hg(SCN)₂ immobilized in epoxy resin, *Talanta* 65(4) (2005) 965–970.
- [54] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Spectrophotometric determination of chloride in waters using a multisyringe flow injection system, *Talanta* 74(5) (2008) 1534–1538.
- [55] L. Yu, X. Zhang, D. Sun, L. Tong, S. Dai, K. Xiao, J. Tu, On-line flow injection spectrophotometric determination of chloride ion in tannery effluent, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* 93(2) (2009) 46–50.
- [56] H.M. Park, Y.M. Kim, D.W. Lee, S.W. Lee, K.B. Lee, Ion chromatographic determination of inorganic anions in environmental samples of Korea, *Analytical Sciences* 18(3) (2002) 343–346.
- [57] P.E. Jackson, Determination of inorganic ions in drinking water by ion chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 20(6–7) (2001) 320–329.
- [58] H. Daraei, A. Maleki, A.H. Mahvi, L. Alaei, R. Rezaee, E. Ghahremani, N. Mirzaei, Simultaneous determination of inorganic anions in bottled drinking water by the ion

chromatography method, *Journal of Water Chemistry and Technology* 37(5) (2015) 253–257.

[59] M. Birke, C. Reimann, A. Demetriades, U. Rauch, H. Lorenz, B. Harazim, W. Glatte, Determination of major and trace elements in European bottled mineral water – Analytical methods, *Journal of Geochemical Exploration* 107(3) (2010) 217–226.

[60] K.W. Edgell, J.E. Longbottom, J.D. Pfaff, Determination of inorganic anions in water by ion chromatography: a collaborative study, *Journal of AOAC International* 77(5) (1994) 1253–1263.

[61] R. Michalski, Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36(2) (2006) 107–127.

[62] B. Wilson, J. Gandhi, C. Zhang, Analysis of inorganic nitrogen and related anions in high salinity water using ion chromatography with tandem UV and conductivity detectors, *Journal of Chromatographic Science* 49(8) (2011) 596–602.

[63] M.C. Gennaro, C. Abrigo, D. Giacosa, G. Saini, Determination of nitrite, nitrate, iodide, bromide, chloride, sulfate, in venice lagoon–water by reversed–phase ion–interaction hplc. the effect of the geographical position, *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology* 30(3) (1995) 675–687.

[64] A. Alcázar, P.L. Fernández–Cáceres, M.J. Martín, F. Pablos, A.G. González, Ion chromatographic determination of some organic acids, chloride and phosphate in coffee and tea, *Talanta* 61(2) (2003) 95–101.

[65] C. López–Moreno, I.V. Pérez, A.M. Urbano, Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat, *Food Chemistry* 194 (2016) 687–694.

[66] R. Salas–Auvert, J. Colmenarez, H. de Ledo M, M. Colina, E. Gutiérrez, A. Bravo, L. Soto, S. Azuero, Determination of anions in human and animal tear fluid and blood serum by ion chromatography, *Journal of Chromatography A* 706(1–2) (1995) 183–189.

- [67] R.P. Singh, S. Ann Smesko, N.M. Abbas, Ion chromatographic characterization of toxic solutions: analysis and ion chemistry of biological liquids, *Journal of Chromatography A* 774(1-2) (1997) 21-35.
- [68] M.M. Rhemrev-Boom, Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection, *Journal of Chromatography A* 680(2) (1994) 675-684.
- [69] H. Sirén, S. Väntsi, Environmental water monitoring by capillary electrophoresis and result comparison with solvent chemistry techniques, *Journal of Chromatography A* 957(1) (2002) 17-26.
- [70] W.P. Yang, B. O'Flaherty, A.L. Cholli, Fast analysis of water samples for detection of anions by capillary zone electrophoresis, *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 36(7) (2001) 1271-1285.
- [71] B.J. Wildman, P.E. Jackson, W.R. Jones, P.G. Alden, Analysis of anion constituents of urine by inorganic capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 546(C) (1991) 459-466.
- [72] P. Kubáň, B. Karlberg, P. Kubá, V. Kubá, Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection, *Journal of Chromatography A* 964(1-2) (2002) 227-241.
- [73] F.R. Rocha, J.A. Fracassi da Silva, C.L. Lago, A. Fornaro, I.G.R. Gutz, Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil. Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Atmospheric Environment* 37(1) (2003) 105-115.
- [74] A. Fornaro, I.G.R. Gutz, Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil. Part 2 - Contribution of formic and acetic acids, *Atmospheric Environment* 37(1) (2003) 117-128.

- [75] J. Doorn, T.T.R. Storteboom, A.M. Mulder, W.H.A. de Jong, B.L. Rottier, I.P. Kema, Ion chromatography for the precise analysis of chloride and sodium in sweat for the diagnosis of cystic fibrosis, *Annals of Clinical Biochemistry* 52(4) (2015) 421–427.
- [76] B.G. Keevil, W.K. Wong, Analysis of sweat chloride by reversed phase high-performance liquid chromatography, *Annals of Clinical Biochemistry* 32(5) (1995) 502–505.
- [77] V.A. LeGrys, Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations, *Journal of Pediatrics* 129(6) (1996) 892–897.
- [78] A.K. Sharma, A. Chetty, Diagnosis of cystic fibrosis by conductometry, *The Indian Journal of Pediatrics* 55(3) (1988) 431–435.
- [79] A.C.V. Mattar, E.N. Gomes, F.V. Adde, C. Leone, J.C. Rodrigues, Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis, *Jornal de Pediatria* 86(2) (2010) 109–114.
- [80] D.A. Skoog, *Fundamentos de química analítica*, Thomson, Madrid, (2005).
- [81] D.C. Harris, *Análisis químico cuantitativo*, Reverté, Barcelona, (2007).
- [82] C.G. Zoski, *Handbook of electrochemistry*, Elsevier, Radarweg, (2007).
- [83] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, Wiley, New York, (2000).
- [84] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley, New York, (2006).
- [85] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, (2004).
- [86] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Screen-printed biosensors in microbiology; a review, *Talanta* 82(5) 1629–1636.
- [87] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013), *Microchimica Acta* 181(9–10) (2014) 865–891.
- [88] J.P. Hart, S.A. Wring, Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16(2) (1997) 89–103.

- [89] J. Cai, K. Cizek, B. Long, K. McAferty, C.G. Campbell, D.R. Allee, B.D. Vogt, J. La Belle, J. Wang, Flexible thick-film electrochemical sensors: Impact of mechanical bending and stress on the electrochemical behavior, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 137(1) (2009) 379–385.
- [90] A.J. Bandonkar, W. Jia, J. Wang, Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review, *Electroanalysis* 27(3) (2015) 562–572.
- [91] G. Matzeu, L. Florea, D. Diamond, Advances in wearable chemical sensor design for monitoring biological fluids, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 211 (2015) 403–418.
- [92] J. Wang, Special Issue for Wearable Electrochemical Sensors, *Electroanalysis* 28(6) (2016) 1148.
- [93] F.W. Campbell, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(1) (2010) 241–259.
- [94] J. Castillo-León, K. Zór, W.E. Svendsen, Self-Assembled Peptide Nanostructures for the Development of Electrochemical Biosensors, in: M. Aliofkhazraei, A.S.H. Makhoulf (Eds.), *Handbook of Nanoelectrochemistry: Electrochemical Synthesis Methods, Properties, and Characterization Techniques*, Springer International Publishing, Cham, (2016).
- [95] F. Pena-Pereira, R.M.B.O. Duarte, A.C. Duarte, Immobilization strategies and analytical applications for metallic and metal-oxide nanomaterials on surfaces, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 40 (2012) 90–105.
- [96] U.S. Mohanty, Electrodeposition: A versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals, *Journal of Applied Electrochemistry* 41(3) (2011) 257–270.
- [97] M.A. Shenashen, S.A. El-Safty, E.A. Elshehy, Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications, *Particle and Particle Systems Characterization* 31(3) (2014) 293–316.
- [98] D.W. Kimmel, G. LeBlanc, M.E. Meschievitz, D.E. Cliffel, Electrochemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry* 84(2) (2012) 685–707.

- [99] R.L. Lacroix, D.R. Keeney, L.M. Walsh, Potentiometric titration of chloride in plant tissue extracts using the chloride ion electrode, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 1(1) (1970) 1-6.
- [100] B.W. Hipp, G.W. Langdale, Use of a solid-state chloride electrode for chloride determinations in soil extracts, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2(4) (1971) 237-240.
- [101] M. Trojanowicz, K. Kolacinska, Recent advances in flow injection analysis, *Analyst* 141(7) (2016) 2085-2139.
- [102] A. Andrade-Eiroa, J.A. Erustes, R. Forteza, V. Cerdá, J.L.F.C. Lima, Determination of chloride by multisyringe flow injection analysis and sequential injection analysis with potentiometric detection, *Analytica Chimica Acta* 467(1-2) (2002) 25-33.
- [103] J. Alpizar, A. Crespi, A. Cladera, R. Forteza, V. Cerdá, Simultaneous Determination of Chloride and Fluoride Ions in Waters by Sequential Injection Analysis, *Electroanalysis* 8(11) (1996) 1051-1054.
- [104] J. Alpizar, A. Crespi, A. Cladera, R. Forteza, V. Cerdá, Simultaneous determination of chloride and pH in wastewaters by sequential injection analysis, *Laboratory Robotics and Automation* 8(3) (1996) 165-170.
- [105] J. Jakmunee, L. Patimapornlert, S. Suteerapataranon, N. Lenghor, K. Grudpan, Sequential injection with lab-at-valve (LAV) approach for potentiometric determination of chloride, *Talanta* 65(3) (2005) 789-793.
- [106] E.V. Telegina, A.L. Moskvin, A.V. Mozhukhin, Flow-injection potentiometric determination of trace concentrations of chloride ions in low-mineralized natural waters, *Journal of Analytical Chemistry* 65(10) (2010) 1041-1044.
- [107] W. Frenzel, Application of flow injection potentiometry to the determination of chloride in various matrices, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 335(8) (1989) 931-937.

- [108] Y.G. Vlasov, Y.E. Ermolenko, I.A. Popov, S.Y. El'-Marug, V.G. Khoroshev, V.V. Kolodnikov, Flow-injection analysis of natural waters with a chloride-selective electrode, *Journal of Analytical Chemistry* 52(1) (1997) 81-84.
- [109] J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, M.R.S. Souto, Potentiometric determination of chloride in vegetables by flow injection analysis, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 27(1-2) (1996) 37-46.
- [110] S.A.A. Almeida, T.S.C.R. Rebelo, A.M. Heitor, M.B.P.P. Oliveira, M.G.F. Sales, Flow-injection potentiometric method for the routine determination of chloride: Application to bread analysis, *Current Analytical Chemistry* 6(4) (2010) 277-287.
- [111] A. Economou, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, Sequential-injection analysis: A useful tool for clinical and biochemical analysis, *Current Pharmaceutical Analysis* 3(4) (2007) 249-261.
- [112] J.C. Chou, C.H. Liu, M.W. Su, C.C. Chen, Chloride ion selective electrode for detection of low chloride ion concentration, *Proceedings - International NanoElectronics Conference, INEC*, (2011).
- [113] G.J. Moody, J.D.R. Thomas, Role of ion-selective electrodes in studies on vegetation, vegetables, fruits, juices and oils, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27(1) (1976) 43-50.
- [114] C.Y. Cheng, Z.M. Huang, W.Y. Chung, D.G. Pijanowska, M. Dawgul, Development of Polymeric Resin Ion-exchanger Based Chloride Ion-selective Electrode for Monitoring Chloride Ion in Environmental Water, *Journal of the Chinese Chemical Society* 59(1) (2012) 122-131.
- [115] F. Hahn, Novel valve for automatic calibration of a chloride sensor for river monitoring, *Biosystems Engineering* 92(3) (2005) 275-284.
- [116] R. De Marco, G. Clarke, B. Pejcic, Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis, *Electroanalysis* 19(19-20) (2007) 1987-2001.

- [117] T.M. Florence, Differential potentiometric determination of parts per billion chloride with ion-selective electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 31(1) (1971) 77-86.
- [118] S. Mehtab, T.I. Siddiqi, Synthesis of macrocyclic ionophore for the development of highly selective chloride sensor, *Oriental Journal of Chemistry* 31(1) (2015) 193-204.
- [119] P. Díaz, Z. González, M. Granda, R. Menéndez, R. Santamaría, C. Blanco, Evaluating capacitive deionization for water desalination by direct determination of chloride ions, *Desalination* 344 (2014) 396-401.
- [120] R. Sundaram, K.S. Hariprasad, Synthesis of chloride ion-selective potentiometric sensor based on coordination polymer complex, *Indian Journal of Chemical Technology* 14(5) (2007) 451-458.
- [121] A. Hulanicki, A. Michalska, All-solid-state chloride-selective electrode with poly(pyrrole) solid contact, *Electroanalysis* 7(7) (1995) 692-693.
- [122] M. Rothmaier, W. Simon, Chloride-selective electrodes based on mercury organic compounds as neutral carriers, *Analytica Chimica Acta* 271(1) (1993) 135-141.
- [123] K.P. Xiao, P. Bühlmann, S. Nishizawa, S. Amemiya, Y. Umezawa, A Chloride Ion-Selective Solvent Polymeric Membrane Electrode Based on a Hydrogen Bond Forming Ionophore, *Analytical Chemistry* 69(6) (1997) 1038-1044.
- [124] R.K. Mahajan, I. Kaur, R. Kaur, S. Uchida, A. Onimaru, S. Shinoda, H. Tsukube, Anion receptor functions of lanthanide tris(β -diketonate) complexes: Naked eye detection and ion-selective electrode determination of Cl⁻ anion, *Chemical Communications* 9(17) (2003) 2238-2239.
- [125] J.N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R.K. Mahajan, R.K. Puri, A chloride selective sensor based on a calix[4]arene possessing a urea moiety, *Tetrahedron Letters* 49(17) (2008) 2772-2775.
- [126] J.N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R.K. Puri, R.K. Mahajan, Chloride ion recognition using thiourea/urea based receptors incorporated into 1,3-disubstituted calix[4]arenes, *New Journal of Chemistry* 33(3) (2009) 675-681.

- [127] V.K. Gupta, R.N. Goyal, R.A. Sharma, Chloride selective potentiometric sensor based on a newly synthesized hydrogen bonding anion receptor, *Electrochimica Acta* 54(17) (2009) 4216–4222.
- [128] V.K. Gupta, Potentiometric sensors for inorganic anions based on neutral carriers, *Arab. J. Sci. Eng.* 35(2A) (2009) 7–25.
- [129] G. Dimeski, T. Badrick, A.S. John, Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences—A review, *Clinica Chimica Acta* 411(5–6) (2010) 309–317.
- [130] A. Lewenstam, Routines and Challenges in Clinical Application of Electrochemical Ion-Sensors, *Electroanalysis* 26(6) (2014) 1171–1181.
- [131] R. Yan, S. Qiu, L. Tong, Y. Qian, Review of progresses on clinical applications of ion selective electrodes for electrolytic ion tests: from conventional ISEs to graphene-based ISEs, *Chemical Speciation & Bioavailability* 28(1–4) (2016) 72–77.
- [132] S. Makarychev-Mikhailov, A. Shvarev, E. Bakker, New trends in ion-selective electrodes, *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, (2008).
- [133] A. Lewenstam, M. Maj-Zurawska, A. Hulanicki, Application of ion-selective electrodes in clinical analysis, *Electroanalysis* 3(8) (1991) 727–734.
- [134] I. Yaroshenko, D. Kirsanov, L. Kartsova, A. Sidorova, I. Borisova, A. Legin, Determination of urine ionic composition with potentiometric multisensor system, *Talanta* 131(0) (2015) 556–561.
- [135] Q. Jiang, D. Mak, S. Devidas, E.M. Schwiebert, A. Bragin, Y. Zhang, W.R. Skach, W.B. Guggino, J.K. Foskett, J.F. Engelhardt, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated atp release is controlled by a chloride sensor, *Journal of Cell Biology* 143(3) (1998) 645–657.
- [136] S. Oka, Y. Sibazaki, S. Tahara, Direct potentiometric determination of chloride ion in whole blood, *Analytical Chemistry* 53(4) (1981) 588–593.
- [137] H. Dahms, Automated potentiometric determination of inorganic blood constituents (Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻), *Clinical Chemistry* 13(6) (1967) 437–450.

- [138] G.A. Álvarez-Romero, M.T. Ramírez-Silva, C.A. Galán-Vidal, M.E. Páez-Hernández, M.A. Romero-Romo, Development of a chloride ion-selective solid state sensor based on doped polypyrrole-graphite-epoxy composite, *Electroanalysis* 22(14) (2010) 1650-1654.
- [139] T. Nguyen-Khoa, J.P. Borgard, R. Miled, M. Rota, Sweat chloride measurement using direct potentiometry: Spotchem® (Elitech-Arkray) evaluation and comparison with coulometry and conductivity, *Annales de Biologie Clinique* 71(4) (2013) 443-448.
- [140] K.J. Fraser, V.F. Curto, S. Coyle, B. Schazmann, R. Byrne, F. Benito-Lopez, R.M. Owens, G.G. Malliaras, D. Diamond, Wearable electrochemical sensors for monitoring performance athletes, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*.
- [141] M.H. Chiu, W.L. Cheng, G. Muthuraman, C.T. Hsu, H.H. Chung, J.M. Zen, A disposable screen-printed silver strip sensor for single drop analysis of halide in biological samples, *Biosensors and Bioelectronics* 24(10) (2009) 3008-3013.
- [142] B. Lou, C. Chen, Z. Zhou, L. Zhang, E. Wang, S. Dong, A novel electrochemical sensing platform for anions based on conducting polymer film modified electrodes integrated on paper-based chips, *Talanta* 105 (2013) 40-45.
- [143] L. Trnkova, V. Adam, J. Hubalek, P. Babula, R. Kizek, Amperometric sensor for detection of chloride ions, *Sensors* 8(9) (2008) 5619-5636.
- [144] N. González-Diéguez, A. Colina, J. López-Palacios, A. Heras, Spectroelectrochemistry at screen-printed electrodes: Determination of dopamine, *Analytical Chemistry* 84(21) (2012) 9146-9153.
- [145] Z.C. G., *Hanbook of Electrochemistry*, Elsevier, Netherlands, (2007).
- [146] C. Fernández-Blanco, A. Colina, A. Heras, UV/Vis spectroelectrochemistry as a tool for monitoring the fabrication of sensors based on silver nanoparticle modified electrodes, *Sensors (Switzerland)* 13(5) (2013) 5700-5711.

**4. DISPOSABLE SENSOR FOR ELECTROCHEMICAL DETERMINATION
OF CHLORIDE IONS**

Como se ha mencionado anteriormente, el ion cloruro es uno de los iones más abundantes de nuestro entorno y desempeña un papel muy importante en diversos campos de actividad como son el medioambiental, agroalimentario, sanitario o industrial.

En este capítulo se describe el desarrollo de un método nuevo, sencillo y económico para la determinación de iones cloruro mediante el uso de sensores voltamperométricos desechables. Teniendo en cuenta que la presencia de iones cloruro en disolución modifica el potencial de equilibrio del electrodo de pseudo referencia de Ag/AgCl, la concentración de este analito se determina a través del cambio sistemático de dicho potencial de una especie de control introducida en el sistema. El desplazamiento del pico voltamperométrico de la especie de control producido es proporcional al logaritmo de la concentración de cloruro, siguiendo un comportamiento nernstiano. Se han utilizado distintas especies de control, en disolución, o directamente impresas en el electrodo de trabajo, obteniendo los mejores resultados usando ferrocenometanol.

El método desarrollado tiene una reproducibilidad inferior al 3% y un límite de detección de 10 mM, y se ha usado con éxito para determinar el contenido de cloruro en agua de mar y en una muestra salina comercial.

Este trabajo ha sido presentado en la *XXXV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química y 1^{er} Simposio E3 del Mediterráneo. Electroquímica para la Energía y el Medio Ambiente* (2014) y ha sido publicado en *Talanta*, 155 (2016) 153–157. También ha dado lugar a la creación de la patente: *“Desarrollo de un sensor desechable para la determinación de cloruros” (P201400313)*.

4.1 Introduction

Since the 1990s, screen-printing technology, adapted from the microelectronics industry, has been profusely used to develop electrochemical sensors, biosensors and immunosensors. Screen-printed technology consists of layer-by-layer deposition of ink upon a solid substrate, through the use of a screen or mesh, defining the geometry of the sensor [1].

Screen-printed electrodes (SPEs) avoid some of the common problems of classical solid electrodes, such as memory effects and tedious cleaning processes, and offer many advantages such as simplicity, low cost, reproducibility, versatility etc.[2, 3].

Moreover, these devices hold great promise for on-site monitoring and are made in serial production, so the electrochemical determination of a wide range of substances is currently undergoing widespread growth in many fields such as food, biomedical or environmental [4, 5]. The adaptability of SPEs is also of great benefit in areas of research; the ability to modify the electrodes with ease, through different inks commercially available for the reference, counter, and working electrodes, allows for highly specific and finely calibrated electrodes to be produced for specific target analytes [6].

The standard screen-printed electrodic systems used in the construction of sensors include a working, a reference and an auxiliary electrode. For their construction successive layers of different inks were printed onto a PVC strip

substrate using several screens [6]. While lots of different conductive pastes had been used to manufacture working or auxiliary electrodes, pastes based of Ag or Ag/AgCl are usually used to develop pseudo-reference electrodes (PRE) [7, 8].

Although scientific interest is primarily devoted to working electrodes, progress with regard to the reference electrodes can also be ascertained, especially for measurements at which it is also important to maintain a reasonably constant comparative potential value for a defined measuring period [9, 10].

In conventional reference electrodes, the Ag/AgCl wire is usually isolated from the solution by a nanoporous ceramic or glass frit and kept in a KCl solution of defined concentration. Owing to the frit, large molecules or ions cannot pass through this barrier, which establishes an ohmic contact between the reference electrode and the sample solution, restricting chemical exchange. However, quite often, PREs are used for on-chip sensors and biosensors due to convenience and the need for miniaturization. Unlike reference electrodes, these electrodes are not isolated from the sample solution, and, therefore, present certain disadvantages regarding potential stability. Nevertheless, the electrochemical properties of the electrode material and its chemical reactivity may play a significant role in the shape of acquired voltage signals [11, 12].

When working with screen-printed electrode systems, it must be taken into account that the potential of PREs is also affected by the medium composition becoming the most important handicap of this kind of device in some applications.

Alternatively, the variation of the equilibrium potential of the PRE by the presence of species, such as chloride ions, which form stable compounds with the components of PRE, can be used as an indicator of the presence of these species, and even allow their quantification.

Chloride ion sensing is important in many fields such as clinical diagnosis [13, 14], environmental monitoring [15–17] and industrial applications [18, 19]. Particularly, the content of chloride ions in waters has been well monitored [20–22]. Seawater is essentially a fairly concentrated solution of various salts. The salt content, i.e. the amount of inorganic substance in solution, is designated as salinity and expressed in g/kg seawater or parts per thousands (‰), with sodium, magnesium, calcium and potassium as predominant cations, and chloride, sulfate, bromide and hydrogen carbonate as predominant anions. Since the chemical composition of seawater remains essentially constant, the measurement of only one chemical constituent is enough to determine the salt content. Therefore, salinity is normally determined by measuring the chloride content because chloride is the most abundant anion in sea water [23].

Numerous analytical methods for chloride ions determination including ion chromatography [24], near-infrared spectrometry [25], spectroscopy [26], light scattering [27, 28] and flow based methods coupled with different detectors [24, 29, 30] have been developed. Regarding electrochemical techniques, amperometric and potentiometric methods have been also described [31, 32]. Potentiometric methods based on ion selective electrodes have been most frequently used, and several sensors for selective chloride ion detection have been suggested [14, 19, 24, 29, 33–37].

In the literature, despite the advantages of using SPEs, electrochemical determination of chloride ions using this kind of sensors was hardly found [38, 39]. Most of them involve silver nanoparticles based SPEs [40–42].

This paper describes the development of a novel, inexpensive, highly simple and disposable sensor for the determination of chloride ions. It is based on the systematic shift of the voltammetric peak of a control species when chloride ions are present in solution. In order to study its influence, different control species were tested. Since potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$), and ferrocenemethanol (FeMeOH), show low redox potentials, they were chosen as control species in this study.

Control species were used in two different ways. In the first one, these were added in the sample solution, and in the other way, the control species were mixed into the carbon paste used to build the working screen-printed electrode.

The disposable character and simplicity of the device provides an interesting alternative to the most frequently used potentiometric method.

4.2 Material and methods

4.2.1 Reagents and solutions

All the reagents used were of analytical grade and Milli Q water (Millipore, Bedford, USA) was employed for preparing all solutions.

KCl, KBr, KNO₃, K₂SO₄, K₃[Fe(CN)₆] and K₄[Fe(CN)₆] were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ferrocenemethanol was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). KCN, Hg₂Cl₂ and PbCl₂ were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Na₂CO₃, K₂CrO₄ and K₂Cr₂O₇ were obtained from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). KBrO₃ was purchased from Productos Químicos Kurz, (Barcelona, Spain).

C10903P14 (carbon ink), C2070508P4 (carbon with ferrocyanide ink) and D2071120D1 (dielectric ink) were purchased from Gwent Electronic Materials (Torfaen, U.K). Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) and Electrodag 418 (Ag ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

Sea water was collected from Cantabrian Sea, Spain. The commercial saline solution (Vitulia) was obtained from a local pharmacy.

4.2.2 Apparatus

Voltammetric measurements were performed with a μ Stat 200 bipotentiostat from Dropsens (Oviedo, Spain), using the DropView software package to control the instrument, register and perform the analysis of results.

Potentiometric measurements were made using chloride-selective electrode pH & ION-Meter GLP 22+Crison (Crison Instruments, Barcelona).

4.2.3 Sensor manufacturing

SPEs were home-produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screen, according to the procedure described elsewhere [1, 43]. Silver and carbon inks were used in manufacture of SPEs. Electrode system consists of a carbon working electrode (area, 12.56 mm²), a carbon counter electrode and a Ag/AgCl PRE.

Carbon working SPEs modified with K₄[Fe(CN)₆], (SPC_{K₄[Fe(CN)₆]}Es) were prepared by using C2070508P4 commercial ink. Carbon working SPEs modified with K₃[Fe(CN)₆], (SPC_{K₃[Fe(CN)₆]}Es) or FeMeOH, (SPC_{FeMeOH}Es) were prepared by incorporating a 3% (w/w) proportion of each compound directly into the C10903P14 carbon ink for printing the working electrodes.

4.2.4 Electrochemical measurements

When using carbon working SPEs, voltammetric measurements were accomplished in a single drop (200 μL), containing 5x10⁻⁴ M K₃[Fe(CN)₆], 5x10⁻⁴ M K₄[Fe(CN)₆] or 2x10⁻⁴ M FeMeOH and the chloride ions sample was deposited onto the surface of the electrode system. In the cases of using SPC_{FeMeOH}Es, SPC_{K₃[Fe(CN)₆]}Es or SPC_{K₄[Fe(CN)₆]}Es a drop of sample solution, containing chloride ions, is directly deposited onto the surface.

Cyclic and differential pulse voltammograms were recorded between -0.4 V and $+0.8$ V when using FeMeOH or $K_4[Fe(CN)_6]$ and, between $+0.8$ and -0.4 V in the case of using $K_3[Fe(CN)_6]$. All the measurements were taken at a scan rate of 20 mV s^{-1} and 10 mV of step potential.

4.3 Results and discussion

When using the screen-printed PREs, as already described above, the equilibrium potential of these electrodes can be altered by the presence in the sample of some species which can interact with silver or chloride ions. In fact, it was observed that the voltammetric peak of a reference species moves when ions such as carbonates, chlorides, bromides, etc., are added to the sample, due to the change in the equilibrium potential of PREs.

In this way, the presence of chloride ion produces a systematical shift of the peak potential of a reference electrochemically rapid system (control system). This shift is related to the amount of chloride in the medium, and it allows the determination of chloride ions in solution.

This behavior, however, is altered when silver paths are used in the manufacturing of screen-printed electrodic system. This phenomenon could be due to the oxidation of the silver of the working electrode paths. Figures 4.1 and 4.2 show the voltammograms recorded over time of a $K_3[Fe(CN)_6]$ solution in the presence of a constant chloride ions concentration using SPEs when the paths were built with silver and carbon respectively.

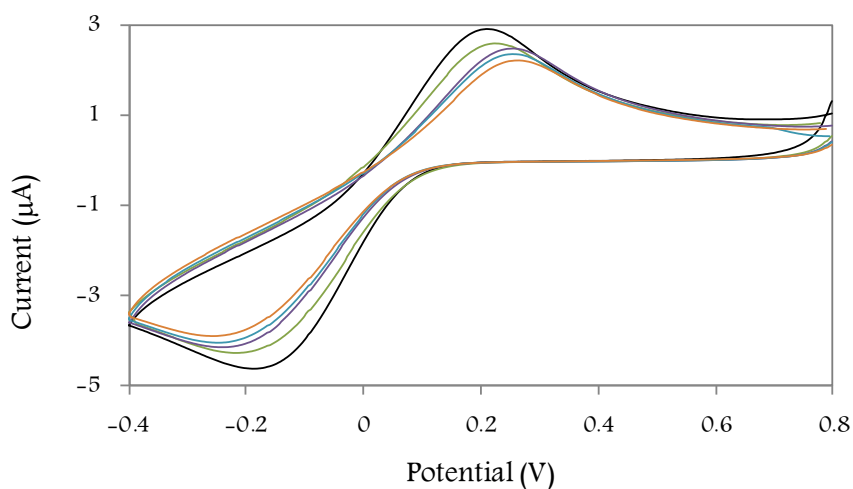


Figure 4.1: Cyclic voltammograms recorded from +0.8 to -0.4 V of $K_3[Fe(CN)_6]$

5×10^{-4} M in 100 mM potassium chloride using silver paths SPE.

Number of scans=5. Scan rate= 20 mV s^{-1}

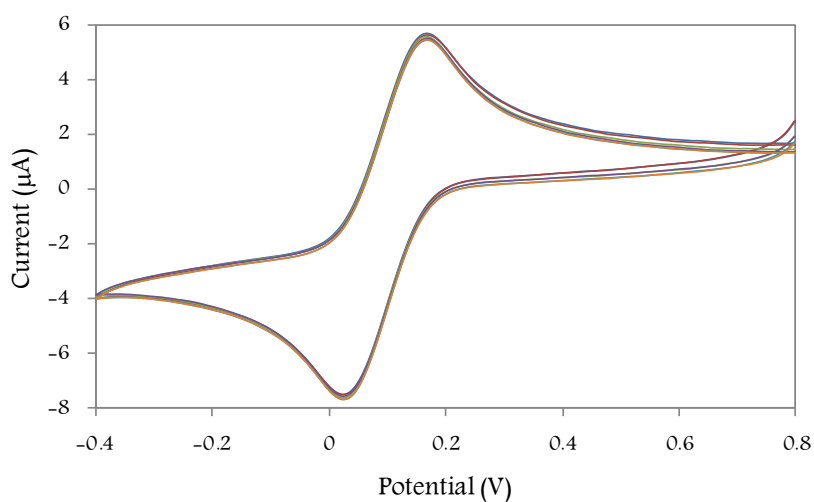


Figure 4.2: Cyclic voltammograms recorded from +0.8 to -0.4 V of $K_3[Fe(CN)_6]$

5×10^{-4} M in 100 mM potassium chloride using carbon paths SPE.

Number of scans=5. Scan rate= 20 mV s^{-1} .

With the latter, the peak potential of the control species $K_3[Fe(CN)_6]$ was found stable and it was not shifting over time, so SPEs built with carbon paths were used in this work.

Three different well known control species, namely FeMeOH, $K_3[Fe(CN)_6]$ and $K_4[Fe(CN)_6]$, have been chosen for the chloride ions determination. Next paragraphs show the results obtained in each case.

a) FeMeOH

In differential pulse voltammetric (DPV) experiments, an anodic peak close to 0.1V, due to oxidation of FeMeOH to $FeMeOH^+$, was obtained. The potential of this oxidation peak moved by raising the chloride concentration from 10 mM to 90 mM, and a linear relationship between peak potential and the logarithm of chloride concentration was obtained in this concentration range. Figure 4.3 shows this behavior. The slopes values (Table 4.1) of these regressions are very close to the theoretical values of Nernstian responses.

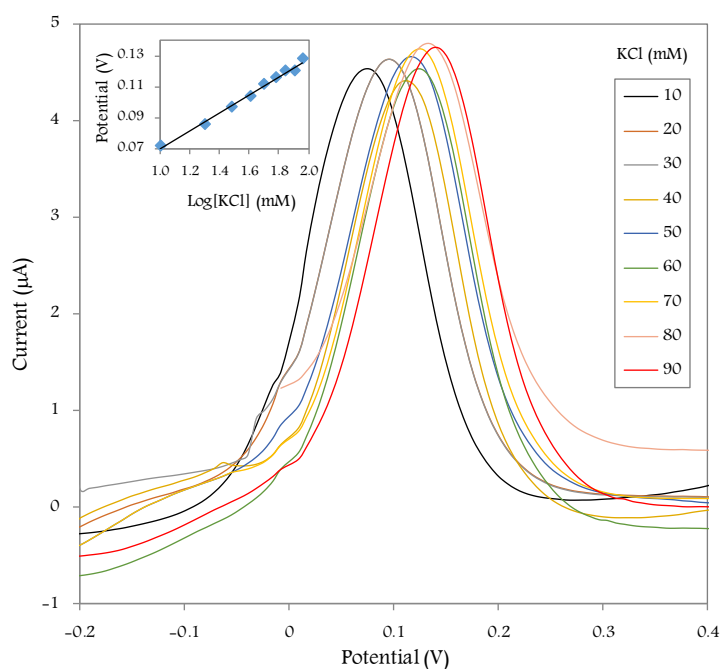


Figure 4.3. Differential pulse voltammograms of 2×10^{-4} M FeMeOH in a batch containing different concentrations of chloride ion. Scan rate= 20 mV s^{-1}
Inset: linear regression between the potential and the logarithm of chloride concentration.

b) $K_3[Fe(CN)_6]$:

DPV experiments carried out with $K_3[Fe(CN)_6]$ lead to a reduction peak, appearing about 0.1 V vs Ag/AgCl/SPE, whose potential peak shifts when increasing the chloride concentration from 200 mM to 900 mM.

In this case, it was observed that the potential change depending on chloride concentration did not follow a Nernstian response (Table 4.1). This fact however still permitted the chloride determination, since a linear behavior between peak potential shift and chloride concentration was observed.

When $SPC_{K_3[Fe(CN)_6]}$ Es electrodes were used, no analytical signals were obtained, due to inherent instability of these printed electrodes.

c) $K_4[Fe(CN)_6]$:

By scanning the potential between -0.8 and 0.4 V, only one DPV peak, at about 0.1 V, attributed to the oxidation of ferrocyanide anions was observed. Its peak potential value kept constant for several minutes making it possible to obtain a linear relationship between oxidation potential of this species and logarithm of chloride concentration (Table 4.1). It was however observed that the presence of chloride ions induced the oxidation of the silver from PRE and the oxidation of control species was affected by the formation of emerging Ag^+ from printed PRE, and new peaks appeared [11]. In fact, up to three different peaks were detected in the voltammograms. This hypothesis is supported by the fact that the addition of silver ions, instead of chloride, causes a similar behavior.

The first oxidation peak moved to anodic potentials in a non-systematic way when increasing chloride concentration. This could be due to the oxidation to ferricyanide anions, forming the insoluble complex $\text{Ag}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. ($K_{ps} 20^\circ\text{C} = 5 \cdot 10^{-19}$) [44]. The other oxidation peaks, which appeared at more positive potentials, are possibly related to the formation of other species, such as Prussian Blue [45]. These peaks decreased until disappearing with increasing chloride concentration.

In order to characterize an analytical method, the reproducibility and repeatability were calculated taking into account the relative standard deviation (RSD) of slopes of calibration curves registered using different sensors, and one single sensor, respectively.

When control species were printed onto the working electrode, it was only possible to perform one experiment with each electrode. For this reason, each experimental measurement was done by using different electrodes. So, in this case, only the reproducibility of method could be calculated.

The performance of the described method was also estimated by the determination of its detection limit. A linear relationship was obtained between the voltammetric potential peaks of control species and logarithm of chloride concentrations in different ranges of concentration. Anomalous points, that would alter intercept and slope values of the calibration curves leading to wrong conclusions, were firstly detected and eliminated by using the PROGRESS program [46], which uses least median square (LMS) in order to detect these anomalous points. Once, those points were removed from calibration set, ordinary least square (OLS)

regressions were built with the remaining points. The parameters of OLS regressions were used to estimate the detection limit of these sensors for a given probability of false positive (α) and negative (β) of 0.05 [47, 48].

Table 4.1: Performance of the developed methods for the voltammetric determination of chloride ion with different control species.

Control species	Calibration curve average slopes	Reproducibility RSD (n-5)	Repeatability RSD (n-5)	Detection limit (mM) α - β -0.05 (n-5)	Calibration Range (mM)
FeMeOH	S 0.0587	1.60	2.67	10	10-100
	P 0.0503	1.71	-	70	70-600
K ₃ [Fe(CN) ₆]	S 0.1687	2.84	1.01	200	200-900
	P -	-	-	-	-
K ₄ [Fe(CN) ₆]	S 0.1451	1.60	3.04	200	200-900
	P 0.0882	1.44	-	200	200-800

S: control species in solution P: control species printed

4.3.1 Interferences

In order to check the selectivity of the method, an interference study was carried out. Since the use of FeMeOH as control species leads to the best results in term of detection limit for determination of chloride ions, this species was chosen to perform this study.

The most important interfering species in the determination of chloride are the ions which form stable silver or chloride compounds. All species which form

these compounds could introduce modifications in the responses, producing a shift or deformation of anodic peaks of FeMeOH.

Thus, the effect of ions such as AsO_4^{2-} , PO_4^{3-} , I^- , CN^- , Br^- , CO_3^{2-} , CrO_4^{2-} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, IO_3^- , BrO_3^- , SO_4^{2-} , Hg^+ , Pb^{2+} , which form insoluble compound ($K_s < 10^{-5}$) with chloride or silver ion was studied as shown in Table 4.2.

Table 4.2. Possible interfering ions in voltammetric chloride determination and concentration at which interference begins to occur. Control species: FeMeOH. Chloride ions concentration 50 mM.

Interferents	Solubility product constant	mM
AsO_4^{3-}	1.0×10^{-22}	Not interfere
PO_4^{3-}	1.3×10^{-20}	0.49
I^-	8.3×10^{-17}	0.98
CN^-	1.2×10^{-16}	1.96
Br^-	5.0×10^{-13}	3.0
CO_3^{2-}	6.2×10^{-12}	Not interfere
CrO_4^{2-}	1.9×10^{-12}	0.5
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	2.7×10^{-11}	1.0
IO_3^-	3.0×10^{-8}	27.6
BrO_3^-	4.0×10^{-5}	Not interfere
SO_4^{2-}	1.6×10^{-5}	Not interfere
Hg_2^{2+}	1.3×10^{-18}	0.99
Pb^{2+}	1.6×10^{-5}	9.96

From the analysis of the results obtained, it seems that there is a relation between K_s values of the studied compounds, and the degree of perturbation introduced. In general, the smaller the K_s , the more these species interfere.

In fact, BrO_3^- and SO_4^{2-} ions, whose silver salts have K_s values higher than silver chloride, do not interfere. This fact is very important because sulfate anion is a significant component present in sea water, while the other interfering ions have a low concentration in sea water samples.

Moreover, AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} and CrO_4^{2-} did not modify the oxidation peak of FeMeOH in aqueous media, since this addition also increased the pH solution to values in which the solubility of Ag_3AsO_4 , Ag_2CO_3 and Ag_2CrO_4 were higher.

4.3.2 Application to sea water and saline samples

In order to check the performance of the developed chloride sensor using FeMeOH as control species, sea water and a commercial saline solution, without any pretreatment, were analyzed. Chloride concentrations, expressed in mmol L^{-1} were calculated from the calibration curves built.

These samples were also measured with a reference method to assess the reliability of the developed sensor. As reference method for the quantification of chloride in sea water and saline solution samples, chloride ion selective electrode (ISE) was used. As it can be seen in Table 4.3, the results obtained with the developed method were in good agreement with those achieved using an ISE and also with the values provided by the manufacturer, in the case of saline solution samples.

Table 4.3. Comparison of concentration of chloride in commercial saline solution and sea water obtained by using SPEs and ISEs.

Control species		Saline solution (mM)		Sea water (mM)	
		SPCE (n-3)	ISE (n-3)	SPCE (n-3)	ISE (n-3)
FeMeOH	Solution	152±2	152±4	525±3	523±8
	Printed	153±2		524±4	

4.4 Conclusions

Nowadays, the development of alternative methods for chloride determination in waters is very interesting due to the problems associated to potentiometric methods, generally used in routine determinations. This work describes the successful development of a low cost method for the detection of chloride ion, which is based on the shift measurement of voltammetric peak potential of a control species, when this ion is present in a solution. Three different control species were tested and it was shown that by using FeMeOH, the analytical method developed is the most selective and allows the determination of chloride in the concentration range from 10 mM to 90 mM. Furthermore, the developed sensor shows good reproducibility and repeatability (RSDs below 3.5 %, n = 5).

The developed electrochemical sensor has relevant advantages compared to other analytical methods previously described. The most important advantages include their easy mass production and their low cost, their simplicity of use and portability, the possibility of to be used with small samples, as well as its ability to

provide continuous real time signals, very useful in environmental monitoring applications.

Although various cations and anions which react with silver or chloride ions interfere its determination, the disposable nature and advantages of the device makes it very beneficial for screening applications, in various water media in which rapid determination of chloride is needed.

4.5 References

- [1] O. Domínguez, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73(2) (2007) 202–219.
- [2] N. Thiyagarajan, J.-L. Chang, K. Senthilkumar, J.-M. Zen, Disposable electrochemical sensors: A mini review, *Electrochemistry Communications* 38(0) (2014) 86–90.
- [3] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013), *Microchimica Acta* 181(9–10) (2014) 865–891.
- [4] C.A. Galán-Vidal, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, Chemical sensors, biosensors and thick-film technology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 14(5) (1995) 225–231.
- [5] J.P. Hart, S.A. Wring, Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16(2) (1997) 89–103.
- [6] J.P. Metters, R.O. Kadara, C.E. Banks, New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments, *Analyst* 136(6) (2011) 1067–1076.
- [7] J.M. Cooper , A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, (2004).

- [8] G. Inzelt, A. Lewestam, F. Scholz, Handbook of Reference Electrodes, Springer, Berlin, (2013).
- [9] U. Guth, F. Gerlach, M. Decker, W. Oelßner, W. Vonau, Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors, *Journal of Solid State Electrochemistry* 13(1) (2009) 27–39.
- [10] A. Michalska, All-Solid-State Ion Selective and All-Solid-State Reference Electrodes, *Electroanalysis* 24(6) (2012) 1253–1265.
- [11] A. Yakushenko, D. Mayer, J. Buitenhuis, A. Offenhäusser, B. Wolfrum, Electrochemical artifacts originating from nanoparticle contamination by Ag/AgCl quasi-reference electrodes, *Lab on a Chip – Miniaturisation for Chemistry and Biology* 14(3) (2014) 602–607.
- [12] E.D. Minot, A.M. Janssens, I. Heller, H.A. Heering, C. Dekker, S.G. Lemay, Carbon nanotube biosensors: The critical role of the reference electrode, *Applied Physics Letters* 91(9) (2007).
- [13] Q. Jiang, D. Mak, S. Devidas, E.M. Schwiebert, A. Bragin, Y. Zhang, W.R. Skach, W.B. Guggino, J.K. Foskett, J.F. Engelhardt, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated atp release is controlled by a chloride sensor, *Journal of Cell Biology* 143(3) (1998) 645–657.
- [14] I. Yaroshenko, D. Kirsanov, L. Kartsova, A. Sidorova, I. Borisova, A. Legin, Determination of urine ionic composition with potentiometric multisensor system, *Talanta* 131(0) (2015) 556–561.
- [15] F. Svegl, K. Kalcher, Y.J. Grosse-Eschedor, M. Balonis, A. Bobrowski, Detection of chlorides in pore water of cement based materials by potentiometric sensors, *Rare Metal Mat. Eng.* 35 (2006) 232–237.
- [16] U. Angst, B. Elsener, C.K. Larsen, Ø. Vennesland, Critical chloride content in reinforced concrete – A review, *Cement and Concrete Research* 39(12) (2009) 1122–1138.
- [17] C. Huber, I. Klimant, C. Krause, T. Werner, T. Mayr, O.S. Wolfbeis, Optical sensor for seawater salinity, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 368(2–3) (2000) 196–202.

- [18] M.M. Rahman, S.B. Khan, G. Gruner, M.S. Al-Ghamdi, M.A. Daous, A.M. Asiri, Chloride ion sensors based on low-dimensional alpha-MnO₂-Co₃O₄ nanoparticles fabricated glassy carbon electrodes by simple I-V technique, *Electrochimica Acta* 103 (2013) 143-150.
- [19] J.N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R.K. Mahajan, R.K. Puri, A chloride selective sensor based on a calix[4]arene possessing a urea moiety, *Tetrahedron Letters* 49(17) (2008) 2772-2775.
- [20] S. Šebková, Determination of Chlorides on Composite Silver Electrodes, *Chemické Listy* 97(4) (2003) 201-205.
- [21] F. Hahn, Novel valve for automatic calibration of a chloride sensor for river monitoring, *Biosystems Engineering* 92(3) (2005) 275-284.
- [22] C.Y. Cheng, Z.M. Huang, W.Y. Chung, D.G. Pijanowska, M. Dawgul, Development of Polymeric Resin Ion-exchanger Based Chloride Ion-selective Electrode for Monitoring Chloride Ion in Environmental Water, *Journal of the Chinese Chemical Society* 59(1) (2012) 122-131.
- [23] C. Huber, T. Werner, C. Krause, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, Energy transfer-based lifetime sensing of chloride using a luminescent transition metal complex, *Analytica Chimica Acta* 364(1-3) (1998) 143-151.
- [24] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, C. Pasquini, J.J.R. Rohwedder, I.M. Raimundo Jr, Chloride-selective membrane electrodes and optodes based on an indium(III) porphyrin for the determination of chloride in a sequential injection analysis system, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36(1) (2004) 49-55.
- [25] R.H. Wu, X.G. Shao, Application of near-infrared spectra in the determination of water soluble chloride ion in plant samples, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis* 26(4) (2006) 617-619.
- [26] M. Philippi, H.S. dos Santos, A.O. Martins, C.M.N. Azevedo, M. Pires, Alternative spectrophotometric method for standardization of chlorite aqueous solutions, *Analytica Chimica Acta* 585(2) (2007) 361-365.

- [27] H. Cao, D.H. Wu, Rapid and sensitive determination of trace chloride ion in drinks using resonance light scattering technique, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* 2008 (2008).
- [28] R.B.R. Mesquita, S.M.V. Fernandes, A.O.S.S. Rangel, Turbidimetric determination of chloride in different types of water using a single sequential injection analysis system, *Journal of Environmental Monitoring* 4(3) (2002) 458-461.
- [29] J. Junsomboon, J. Jakmunee, Determination of chloride in admixtures and aggregates for cement by a simple flow injection potentiometric system, *Talanta* 76(2) (2008) 365-368.
- [30] V.G. Bonifácio, L.C. Figueiredo-Filho, L.H. Marcolino Jr, O. Fatibello-Filho, An improved flow system for chloride determination in natural waters exploiting solid-phase reactor and long pathlength spectrophotometry, *Talanta* 72(2) (2007) 663-667.
- [31] R.G. Du, R.G. Hu, R.S. Huang, C.J. Lin, In situ measurement of Cl⁻ concentrations and pH at the reinforcing steel/concrete interface by combination sensors, *Analytical Chemistry* 78(9) (2006) 3179-3185.
- [32] S. Muralidharan, V. Saraswathy, K. Thangavel, N. Palaniswamy, Electrochemical studies on the performance characteristics of alkaline solid embeddable sensor for concrete environments, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 130(2) (2008) 864-870.
- [33] K.G. Kumar, K.S. John, C.J. Indira, A chloride ion-selective potentiometric sensor based on a polymeric Schiff base complex, *Indian Journal of Chemical Technology* 13(1) (2006) 13-16.
- [34] T.V. Shishkanova, D. Sýkora, J.L. Sessler, V. Král, Potentiometric response and mechanism of anionic recognition of heterocalixarene-based ion selective electrodes, *Analytica Chimica Acta* 587(2) (2007) 247-253.
- [35] V.K. Gupta, Potentiometric sensors for inorganic anions based on neutral carriers, *Arab. J. Sci. Eng.* 35(2A) (2009) 7-25.

- [36] M. Torres-Luque, E. Bastidas-Arteaga, F. Schoefs, M. Sánchez-Silva, J.F. Osma, Non-destructive methods for measuring chloride ingress into concrete: State-of-the-art and future challenges, *Construction and Building Materials* 68(0) (2014) 68-81.
- [37] B.J. Sucman E., Determination of chlorides in foods using ion-selective electrodes: A review, *Canadian journal of analytical sciences and spectroscopy* 47 (2002) 5.
- [38] M.H. Chiu, W.L. Cheng, G. Muthuraman, C.T. Hsu, H.H. Chung, J.M. Zen, A disposable screen-printed silver strip sensor for single drop analysis of halide in biological samples, *Biosensors and Bioelectronics* 24(10) (2009) 3008-3013.
- [39] A. Cranny, N.R. Harris, M. Nie, J.A. Wharton, R.J.K. Wood, K.R. Stokes, Screen-printed potentiometric Ag/AgCl chloride sensors: Lifetime performance and their use in soil salt measurements, *Sensors and Actuators, A: Physical* 169(2) (2011) 288-294.
- [40] L. Trnkova, V. Adam, J. Hubalek, P. Babula, R. Kizek, Amperometric sensor for detection of chloride ions, *Sensors* 8(9) (2008) 5619-5636.
- [41] J. Gonzalo-Ruiz, R. Mas, C. de Haro, E. Cabruja, R. Camero, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz, Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat, *Biosensors and Bioelectronics* 24(6) (2009) 1788-1791.
- [42] H.S. Toh, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R.G. Compton, Electrochemical detection of chloride levels in sweat using silver nanoparticles: A basis for the preliminary screening for cystic fibrosis, *Analyst* 138(15) (2013) 4292-4297.
- [43] O. Domínguez, M.J.A. Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes, *Analytica Chimica Acta* 589(2) (2007) 255-260.
- [44] A. Bellomo, A. Casale, D. Demarco, Formation of ferricyanides-I silver (I), copper (II) and cadmium(II), *Talanta* 20(3) (1973) 335-338.
- [45] A.A. Karyakin, Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications, *Electroanalysis* 13(10) (2001) 813-819.
- [46] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, (1989).

[47] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Geléncsér, A. Hulanicki, Compendium of Analytical Nomenclature, 3rd ed., Port City Press Inc, Baltimore, (2000).

[48] ISO 11843, Capability of detection Genève, Switzerland, Part I (1997) and Part II (2000).

**5. DEVELOPMENT OF A WEARABLE ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR
VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF CHLORIDE IONS**

Actualmente, los dispositivos conocidos como “wearable sensors” son de gran interés ya que ofrecen nuevas e interesantes vías en el campo de los sensores electroquímicos portátiles, brindando muchas oportunidades para monitorizar continuamente el medioambiente y el cuerpo humano a través de la medida de una amplia gama parámetros significativos de su estado.

Por este motivo, en este capítulo se describe el desarrollo de un “wearable sensor” voltamperométrico, basado en el desplazamiento del pico de oxidación del ferrocenometanol, que presenta una relación lineal con el logaritmo de la concentración de cloruro. Las medidas se realizan de manera sencilla, colocando una gota de la disolución de interés directamente sobre la superficie del sensor. Se han estudiado diferentes sustratos flexibles y textiles como soportes de estos sistemas electródicos, y se ha observado que el Gore-Tex® es un sustrato óptimo para este tipo de sensores debido a las excelentes propiedades que presenta.

La reproducibilidad del método desarrollado es inferior al 3% y presenta un límite de detección de 0.2 mM Este sensor se ha utilizado para determinar la concentración de iones cloruro en agua de mar, obteniéndose buenos resultados.

Este trabajo fue presentado en la XXXVI Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química y XV Encuentro Ibérico de Electroquímica (2015) y fue publicado en *Sensors and Actuators B* 240 (2017) 224–228.

5.1 Introduction

Since the mid-1980s, the screen printing technology has offered mass production of highly reproducible yet inexpensive electrode systems. The screen printing process involves the patterned deposition of conducting and insulating inks onto planar substrates by pressing the ink through a stencil or screen mask [1, 2]. The basic composition for these inks includes a conductive material (i.e., graphite, gold, silver, etc.), a polymer or resin or epoxy, a binding agent and a solvent. Post-printing treatment varies by the formulation, but typically these thick-films are cured at high temperatures or dried at room temperature for a period of time. The electrodes can be easily modified, through the addition of specific functional materials to the ink formulation or in connection to different surface coatings.

Another variable in these thick-film electrodes, besides the material being printed, is the substrate itself. The adaptation of the screen-printing process for the preparation of wearable textile-based electrochemical sensors required a detailed understanding of the influence of manufacturing conditions and substrate properties on the functionality of the resulting devices. The textile substrate itself must be compatible with the printing process and with the specific operational environment. Rigid solid supports (e.g., alumina, ceramic), which were used initially, are not suitable for use as wearable on-body sensors and are not compatible with current flexible-electronics and display systems. Polymeric substrates, such as flexible polyimides, or plastic PVC, have thus been introduced to meet the growing biomedical and industrial demands for more flexible and less rigid electrodes. These

initial studies using polymeric substrates have spawned the recent development of flexible solar cells [3], implantable Kapton-based biomedical sensing devices [4], chemical sensors on flexible polyester films [5], or pressure sensors on flexible polyethylene naphthalate (PEN) [6]. Indeed, flexible devices are now widely sought in connection to flexible-electronics [7], organic field effect transistors [8], optical organic light emitting diodes [9], or flexible displays [10]. The major challenge to this surge is not only their manufacture, but in the stability of these devices in terms of mechanical, electrical, or electrochemical properties [11].

Fabrics represent an excellent class of substrates for developing wearable sensors because they can be in constant contact with the skin. Furthermore, the large surface area of textiles provides ample space for integrating the accompanying electronics. Various fabrics such as wool, cotton, nylon and polyester offer a rich variety of physical and chemical properties that can be utilized for incorporating chemical sensors within the fabric [12, 13].

An optimal textile must possess inert properties, should not affect the electrochemical behavior of the analyte, and should be a suitable platform for integrating multiple sensors. The sensors should also adhere well to the textile and operate desirably under normal and heavy wear [14]. Additionally, liquid phase measurements require the utilization of water-proof fabrics, which would serve as excellent platforms for facilitating chemical reactions in vitro [12].

Electrochemical sensors are promising as wearable chemical sensors which are suitable for diverse applications because of their high performance, inherent

miniaturization, and low cost. A wide range of wearable electrochemical sensors and biosensors have been developed for real-time non-invasive monitoring of electrolytes and metabolites in sweat [15–23], tears [24–31], or saliva [32–35] as indicators of a wearer's health status. Wearable electrochemical sensors, including amperometric and potentiometric sensors have already been described in literature concerning the determination of chloride ions [36–39].

With continued innovation and attention to key challenges, such non-invasive electrochemical sensors and biosensors are expected to open up new, exciting avenues in the field of wearable wireless sensing devices and body-sensor networks, and thus find considerable use in a wide range of personal health-care monitoring applications, as well as in sport, environmental and military applications [13].

This article examines the fabrication of wearable electrochemical sensors directly onto clothing structures or flexible substrates. In the following sections, we will describe their preparation and characterization taking into account some requirements that these supports have to fulfil to act as substrates in this kind of sensor.

Finally, we will propose a low-cost, disposable, highly-simple, wearable and voltammetric Gore-Tex® screen-printed sensor for the determination of chloride ions based on the shift suffered by the voltammetric peak potential of a control species (FeMeOH), when this ion is present in the solution.

5.2 Experimental

5.2.1 Reagents and solutions

All the reagents used were of analytical grade and Milli Q water (Millipore, Bedford, USA) was employed to prepare all solutions.

K₂SO₄ and KCl were provided by Merck (Darmstadt, Germany). FeMeOH was obtained by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Sea water was collected from the Cantabrian Sea, Spain.

C10903P14 (carbon ink) and D2071120D1 (dielectric ink) were purchased from Gwent Electronic Materials (Torfaen, U.K). Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) and Electrodag 418 (Ag ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

PET of 18 μm and paper were purchased from Hifi Industrial Films (France), greaseproof paper was obtained from Bosque Verde (Holland), adhesive label and cellulose acetate were provided by Apli Paper S.A. (Barcelona). Commercial polyester and nylon fabrics were supplied by a local shop, and 3-Layer Gore-Tex® laminate Waterproof Breathable Ripstop Nylon Fabric was supplied by Rockywoods (Loveland, USA). These flexible materials and fabrics were used as printing substrates.

5.2.2 Apparatus

Voltammetric measurements were performed with a μ Stat 200 bipotentiostat from Dropsens (Oviedo, Spain) using the DropView software package to control the instrument register and perform the analysis of results.

Potentiometric measurements were made using chloride-selective electrode pH & ION-Meter GLP 22+Crison (Crison Instruments, Barcelona).

5.2.3 Sensor manufacturing

Home-made SPEs. used in this work, consist of a carbon working electrode (area 12.56 mm²), a carbon counter electrode and a silver/silver chloride as a pseudo-reference electrode (PRE). Carbon ink was used in conductive paths of SPEs. These electrodes were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using different supports according to the procedure described elsewhere [1, 40]. The fabrics were pre-heated to 120°C for 1 hour before the printing process.

5.2.4. Electrochemical measurements

Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed between -0.4 V to 0.8 V vs. Ag/AgCl PRE, in a drop deposited onto the surface of an electrodic system, which contains FeMeOH 5 mM in KCl 0.1 M at a scan rate of 50 mV s⁻¹.

Differential pulse voltammograms (DPV) were recorded from -0.4 V to 0.8 V vs. Ag/AgCl PRE, in a drop deposited onto the surface of an electrodic system.

The sample droplet contains chloride ions, FeMeOH $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ and K_2SO_4 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ as supporting electrolyte. The scan rate was 20 mV s^{-1} and the step potential was 5 mV.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Study of manufactured flexible and wearable sensors

Firstly, a qualitative test of the ink adherences in the different substrates was carried out. This test consists of an adhesive tape which is habitually used to determine if the inks adhered properly to the substrates.

When using PET of $18 \mu\text{m}$, greaseproof papers or adhesive labels as a substrate, the resulting electrodes do not offer good adhesion to the support.

Afterwards, electric resistance of different inks printed in the rest of supports was studied by using a digital multimeter, and the values obtained are shown in Table 5.1. As the electrical conductivity is reciprocal of electric resistivity, and the resistance is proportional to resistivity, low resistance values indicate that a material readily allows the flow of electric current. The tested materials which exhibit a good ink adhesion and possess suitable conductivity, could be used as electrochemical transducers.

Table 5.1. Resistance of the produced electrodes and precision values of manufactured sensors in different substrates. Precision calculated in terms of relative standard deviation (RSD) of cyclic voltammetric oxidation (Pox) and reduction (Pred) peaks of a 5 mM FeMeOH solution.

Substrates	Resistance (Ω)	RSD (n-5)			
		Repeatability		Reproducibility	
		Pox	Pred	Pox	Pred
Cellulose acetate	6.32	2.64	3.31	5.32	1.51
PET of 18 μ m	-	-	-	-	-
Paper	2.45	4.13	1.76	2.17	3.00
Greaseproof paper	-	-	-	-	-
Adhesive Label	-	-	-	-	-
Polyester fabric	0.22	-	-	-	-
Nylon fabric	0.14	3.30	8.64	13.53	25.36
Gore-Tex® fabric	0.01	2.63	2.85	3.21	3.42

Once the study of adhesion and conductivity of the sensor components was completed, their electrochemical characterization was performed. Reproducibility and repeatability were calculated from the relative standard deviation of current values of registered oxidation and reduction peaks of a well-known redox species, such as FeMeOH. Table 5.1 shows the good values obtained. In the case of polyester, the textile absorbed the sample solution, leading to a deterioration in sensing ability over time, so they are not suitable substrates for this type of wearable sensor. Therefore, the devices manufactured by using cellulose acetate, paper or Gore-Tex® have an excellent precision in terms of reproducibility and repeatability, so this fact

makes them appropriate substrates to be used in manufacturing flexible electrochemical sensors for several applications.

The use of a Gore-Tex® substrate offers a good printing resolution because of the great hydrophobicity exhibited by this fabric and its water repellent properties, due to its densely-woven structure, so it could be an excellent material to use as substrate for the construction of stable sensors from an operational perspective.

For these reasons, this material was chosen for the development of a new wearable electrochemical sensor.

5.3.2 Determination of chloride ions using a Gore-Tex® electrochemical sensor

When using screen-printed PRE, the equilibrium potential of these electrodes can be altered by the presence of some anions capable of forming insoluble products with silver ions, as it was described in a previous study [31].

In that study, it was proven that sulphate is not an interfering anion in the determination of chloride ions in these conditions, so it is possible to use K_2SO_4 , as a supporting electrolyte.

The FeMeOH oxidation process was properly observed by using screen-printed electrodes in Gore-Tex® leading to a well-defined differential pulse voltammetric peak near to 0.0 V. It was observed that the presence of chloride ions produces a notorious shift of the oxidation peak potential of FeMeOH in a systematic way. This anodic displacement is related to the amount of chloride in the medium, and it allowed the determination of chloride ions in the solution. Figure 5.1 shows the voltammograms recorded at different concentrations of chloride ions, as well as

the linear relationship obtained between oxidation peak potentials and the logarithm of chloride concentrations.

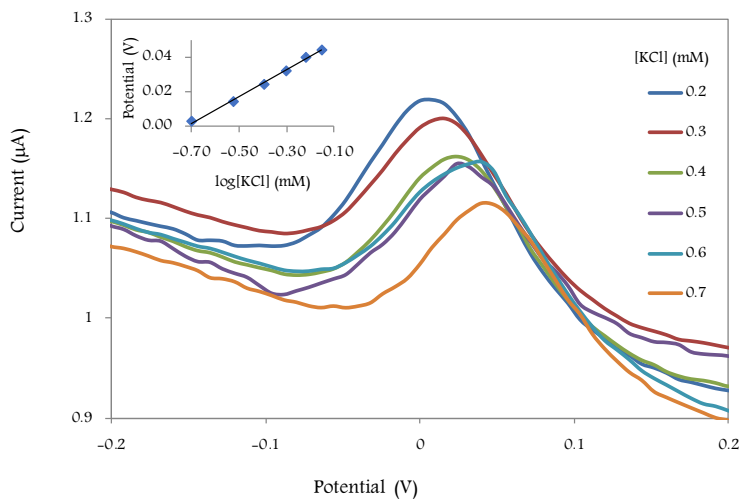


Figure 5.1: Differential pulse voltammograms recorded using a Gore-Tex®-based sensor from -0.4 V to $+0.8$ V in a drop of sample in presence of different concentrations of chloride ions and $\text{FeMeOH } 5 \times 10^{-4}$ M. Scan rate = 20 mV s^{-1} .

Inset: linear calibration curve between the potential and the logarithm of chloride concentration.

In fact, the response of sensors printed on Gore-Tex® to chloride concentrations is linear from 0.2 mM to 0.7 mM. Slopes values of calibration curves, which are shown in table 2, agree with the theoretical slope of the Nernst equation (0.059 V).

In order to characterize the analytical method, the reproducibility and repeatability were calculated taking into account the relative standard deviation

(RSD) of slopes of calibration curves registered using different sensors (2.47%, n=5), and one single sensor (2.65%, n=5), respectively (Table 5.2).

The calibration slope values of measurements taken over time by these sensors, kept constant inside of the defined parameters, at least during 3 months.

Table 5.2: Calibration parameters to evaluate the precision of the method in terms of relative standard deviation.

Gore-Tex® sensor	Reproducibility (different sensors)			Repeatability (single sensor)		
	Calibration curves	Slope (V mM ⁻¹)	Intercept (V)	R ²	Slope (V mM ⁻¹)	Intercept (V)
1	0.0615	0.0531	0.9948	0.0630	0.0549	0.9955
2	0.0630	0.0549	0.9955	0.0651	0.0539	0.9912
3	0.0615	0.0516	0.9900	0.0616	0.0526	0.9930
4	0.0652	0.0553	0.9978	0.0612	0.0548	0.9982
5	0.0627	0.0528	0.9911	0.0644	0.0526	0.9974
RSD (n=5)	2.47			2.65		

The performance of the described methods was also estimated by the determination of its detection limit. A linear relationship was obtained between the oxidation potential peaks of FeMeOH and logarithm of chloride concentrations in the concentration range. Anomalous points, that would alter intercept and slope values of the calibration curves leading to wrong conclusions, were firstly detected and eliminated by using the PROGRESS program [41], which uses least median square (LMS) in order to detect these anomalous points. Once those points were

removed from calibration set, ordinary least square (OLS) regressions were built with the remaining points.

The parameters of OLS regressions were used to estimate the detection limit of this sensor for a given probability of false positive (α) and negative (β) of 0.05 [42–44]. The minimum detectable concentration computed was 0.074mM. Since the value obtained is below the lowest calibration standard, 0.2 mM, the latter was taken as average detection limit from an analytical perspective.

5.3.3 Application to sea water

In order to check the performance of Gore-*Tex*® developed sensor, chloride ions content in sea water was analyzed, and to assess the reliability of the developed sensor, the results were compared with those obtained by using a reference method.

Sea water sample was diluted by a factor of 1/1000 and was prepared by mixing 10 μ L of sea water collected without any pretreatment, with 100 μ L of FeMeOH 5×10^{-3} M, 1 mL of K_2SO_4 5×10^{-3} M and adjusting the solution to 10 mL with deionized water. A single drop (100 μ L) of this mixture, which contains sea water, FeMeOH 5×10^{-5} M and K_2SO_4 5×10^{-3} M, was deposited onto SPCEs based Gore-*Tex*® sensors surfaces and DPV measurements were recorded. This sample is measured three times.

The potential peak value obtained of the diluted sample was introduced in calibration curves previously built (section 5.3.2) and the chloride concentration for diluted sea water sample, expressed in $mmol L^{-1}$, was calculated from corresponding linear regression. The experimentally measured values were 0.525 ± 0.005 mM ($n=3$,

95% confidence interval for mean) for diluted sea water samples, so the chloride ions concentration of undiluted sea water sample was 525 mM.

As reference method for the quantification of chloride in this sample, ion selective electrode (ISE) was used. A linear regression between potential and logarithm of chloride concentration was obtained from potentiometric measurements of solutions which contain 0.1 M KNO_3 and different concentrations of KCl. The chloride concentration in the sea water sample was calculated from this calibration curve. The chloride concentration obtained was 523 ± 8 mM which is in good agreement with those achieved using the Gore-Tex® sensor.

5.4 Conclusions

Screen-printing technology represents a well-established technique for the fabrication of electrochemical sensors with high sensitivity and selectivity. It can be successfully extended from rigid substrates to flexible materials like paper, clothes, etc. It has been proven that Gore-Tex® is suitable as a textile electrodic support, since it makes possible the direct printing of an electrochemical sensor, its satisfactory electrochemical behavior, as well as its high degree of hydrophobicity and water-proof properties.

According to the need and interest of wearable electrochemical sensors, a Gore-Tex® sensor has been successfully fabricated for the determination of chloride ions. It works by measuring the Nernstian shift suffered by the oxidation peak potential of FeMeOH, when chloride ions are present in the solution.

This sensor shows good reproducibility and repeatability (RSDs below 3.0, n =5) and the detection limit has been decreased with regard to the sensor previously performed, based on the same measurement method. This developed sensor presents relevant advantages when real time analysis and rapid determination is needed, such as the chloride content in sea water.

5.5 References

- [1] O. Domínguez, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73(2) (2007) 202–219.
- [2] J. Wang, *Electrochemical sensors Analytical Electrochemistry*, (2006).
- [3] H. Gleskova, I.C. Cheng, S. Wagner, J.C. Sturm, Z. Suo, Mechanics of thin-film transistors and solar cells on flexible substrates, *Solar Energy* 80(6) (2006) 687–693.
- [4] A. Kagie, D.K. Bishop, J. Burdick, J.T. La Belle, R. Dymond, R. Felder, J. Wanga, Flexible rolled thick-film miniaturized flow-cell for minimally invasive amperometric sensing, *Electroanalysis* 20(14) (2008) 1610–1614.
- [5] D. Nilsson, T. Kugler, P.O. Svensson, M. Berggren, An all-organic sensor-transistor based on a novel electrochemical transducer concept printed electrochemical sensors on paper, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 86(2–3) (2002) 193–197.
- [6] Y. Noguchi, T. Sekitani, T. Someya, Organic-transistor-based flexible pressure sensors using ink-jet-printed electrodes and gate dielectric layers, *Applied Physics Letters* 89(25) (2006).
- [7] T. Sekitani, S. Iba, Y. Kato, Y. Noguchi, T. Sakurai, T. Someya, Submillimeter radius bendable organic field-effect transistors, *Journal of Non-Crystalline Solids* 352(9–20 SPEC. ISS.) (2006) 1769–1773.

- [8] N. Stutzmann, R.H. Friend, H. Sirringhaus, Self-aligned, vertical-channel, polymer field-effect transistors, *Science* 299(5614) (2003) 1881-1884.
- [9] P. Calvert, Inkjet printing for materials and devices, *Chemistry of Materials* 13(10) (2001) 3299-3305.
- [10] J.A. Rogers, Z. Bao, Printed plastic electronics and paperlike displays, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 40(20) (2002) 3327-3334.
- [11] J. Cai, K. Cizek, B. Long, K. McAferty, C.G. Campbell, D.R. Allee, B.D. Vogt, J. La Belle, J. Wang, Flexible thick-film electrochemical sensors: Impact of mechanical bending and stress on the electrochemical behavior, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 137(1) (2009) 379-385.
- [12] J.R. Windmiller, J. Wang, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis* 25(1) (2012) 29-46.
- [13] A.J. Bandodkar, J. Wang, Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review, *Trends in Biotechnology* 32(7) (2014) 363-371.
- [14] M.C. Chuang, J.R. Windmiller, P. Santhosh, G.V. Ramírez, M. Galik, T.Y. Chou, J. Wang, Textile-based Electrochemical Sensing: Effect of Fabric Substrate and Detection of Nitroaromatic Explosives, *Electroanalysis* 22(21) (2010) 2511-2518.
- [15] B. Schazmann, D. Morris, C. Slater, S. Beirne, C. Fay, R. Reuveny, N. Moyna, D. Diamond, A wearable electrochemical sensor for the real-time measurement of sweat sodium concentration, *Anal. Methods* 2(4) (2010) 342-348.
- [16] J. Gonzalo-Ruiz, R. Mas, C. de Haro, E. Cabruja, R. Camero, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz, Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat, *Biosensors and Bioelectronics* 24(6) (2009) 1788-1791.
- [17] T. Guinovart, M. Parrilla, G.A. Crespo, F.X. Rius, F.J. Andrade, Potentiometric sensors using cotton yarns, carbon nanotubes and polymeric membranes, *Analyst* 138(18) (2013) 5208-5215.

- [18] W.Z. Jia, A.J. Bandodkar, G. Valdes-Ramirez, J.R. Windmiller, Z.J. Yang, J. Ramirez, G. Chan, J. Wang, Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration, *Analytical Chemistry* 85(14) (2013) 6553–6560.
- [19] K. Mitsubayashi, Y. Wakabayashi, D. Murotomi, T. Yamada, T. Kawase, S. Iwagaki, I. Karube, Wearable and flexible oxygen sensor for transcutaneous oxygen monitoring, *Sens. Actuator B-Chem.* 95(1-3) (2003) 373–377.
- [20] A.J. Bandodkar, V.W.S. Hung, W.Z. Jia, G. Valdes-Ramirez, J.R. Windmiller, A.G. Martinez, J. Ramirez, G. Chan, K. Kerman, J. Wang, Tattoo-based potentiometric ion-selective sensors for epidermal pH monitoring, *Analyst* 138(1) (2013) 123–128.
- [21] T. Guinovart, A.J. Bandodkar, J.R. Windmiller, F.J. Andrade, J. Wang, A potentiometric tattoo sensor for monitoring ammonium in sweat, *Analyst* 138(22) (2013) 7031–7038.
- [22] A.J. Bandodkar, D. Molinnus, O. Mirza, T. Guinovart, J.R. Windmiller, G. Valdes-Ramirez, F.J. Andrade, M.J. Schoning, J. Wang, Epidermal tattoo potentiometric sodium sensors with wireless signal transduction for continuous non-invasive sweat monitoring, *Biosensors & Bioelectronics* 54 (2014) 603–609.
- [23] D. Khodagholy, V.F. Curto, K.J. Fraser, M. Gurfinkel, R. Byrne, D. Diamond, G.G. Malliaras, F. Benito-Lopez, R.M. Owens, Organic electrochemical transistor incorporating an ionogel as a solid state electrolyte for lactate sensing, *Journal of Materials Chemistry* 22(10) (2012) 4440–4443.
- [24] L.C. Gilday, N.G. White, P.D. Beer, Triazole- and triazolium-containing porphyrin-cages for optical anion sensing, *Dalton Transactions* 41(23) (2012) 7092–7097.
- [25] X. Qin, H. Wang, Z. Miao, X. Wang, Y. Fang, Q. Chen, X. Shao, Synthesis of silver nanowires and their applications in the electrochemical detection of halide, *Talanta* 84(3) (2011) 673–678.
- [26] A. Haider, I.K. Kang, Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A comprehensive review, *Advances in Materials Science and Engineering* 2015 (2015).

- [27] S.D. Pretty, A.Y. Musa, J.C. Wren, Reactions of bromide and iodide ions with silver oxide films on Ag substrates, *Journal of the Electrochemical Society* 160(1) (2013) H13-H21.
- [28] A.J. Bandodkar, W. Jia, J. Wang, Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review, *Electroanalysis* 27(3) (2015) 562-572.
- [29] A.G. Brolo, S.D. Sharma, Using probe beam deflection (PBD) to investigate the electrochemical oxidation of silver in perchlorate media in the presence and absence of chloride ions, *Electrochimica Acta* 48(10) (2003) 1375-1384.
- [30] H. Yao, Y. Liao, A.R. Lingley, A. Afanasiev, I. Lahdesmaki, B.P. Otis, B.A. Parviz, A contact lens with integrated telecommunication circuit and sensors for wireless and continuous tear glucose monitoring, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22(7) (2012).
- [31] J. Bujes-Garrido, M.J. Arcos-Martínez, Disposable sensor for electrochemical determination of chloride ions, *Talanta* 155 (2016) 153-157.
- [32] A.A. Karyakin, Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications, *Electroanalysis* 13(10) (2001) 813-819.
- [33] C. Villagrán, M. Deetlefs, W.R. Pitner, C. Hardacre, Quantification of Halide in Ionic Liquids Using Ion Chromatography, *Analytical Chemistry* 76(7) (2004) 2118-2123.
- [34] F. Hao, P.R. Haddad, T. Ruther, IC determination of halide impurities in ionic liquids, *Chromatographia* 67(5-6) (2008) 495-498.
- [35] T.K. Malongo, S. Patris, P. Macours, F. Cotton, J. Nsangu, J.M. Kauffmann, Highly sensitive determination of iodide by ion chromatography with amperometric detection at a silver-based carbon paste electrode, *Talanta* 76(3) (2008) 540-547.
- [36] G. Lisak, J. Cui, J. Bobacka, Paper-based microfluidic sampling for potentiometric determination of ions, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 207(PB) (2015) 933-939.
- [37] B.H. Lou, C.G. Chen, Z.X. Zhou, L.L. Zhang, E.K. Wang, S.J. Dong, A novel electrochemical sensing platform for anions based on conducting polymer film modified electrodes integrated on paper-based chips, *Talanta* 105 (2013) 40-45.

- [38] R. Morello, C. De Capua, M. Lugara, A. Lay-Ekuakille, G. Griffo, P. Vergallo, Design of a Wearable Sweat Sensor for Diagnosing Cystic Fibrosis in Children, 2013 Ieee International Symposium on Medical Measurements and Applications Proceedings, Ieee, New York, (2013).
- [39] G. Lisak, T. Arnebrant, T. Ruzgas, J. Bobacka, Textile-based sampling for potentiometric determination of ions, *Analytica Chimica Acta* 877 (2015) 71-79.
- [40] J. Wang, Decentralized electrochemical monitoring of trace metals: from disposable strips to remote electrodes. Plenary lecture, *Analyst* 119(5) (1994) 763-766.
- [41] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, (1989).
- [42] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.S. Sanchez, M.B. Sanz, M.E. Rueda, D. Gimenez, M.E. Melendez, Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 69(1-2) (2003) 21-33.
- [43] ISO 11843, Capability of detection Genève, Switzerland, Part I (1997) and Part II (2000).
- [44] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Geléncsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed., Port City Press Inc, Baltimore, (2000).

**6. DETERMINATION OF HALIDES USING AG NANOPARTICLES-MODIFIED
DISPOSABLE ELECTRODES. A FIRST APPROACH OF WEARABLE SENSOR FOR
MONITORING OF CHLORIDE IONS.**

En los últimos años, el interés por los nanomateriales está creciendo en muchos campos debido a las buenas propiedades que poseen. El uso de nanopartículas en electroanálisis es un área de investigación que se está expandiendo continuamente, ya que se están obteniendo mejoras en las determinaciones analíticas cuando están presentes en el sistema.

En este capítulo se expone el desarrollo un método voltamperométrico para la determinación de iones cloruro, bromuro y yoduro mediante la electrodeposición de nanopartículas de plata sobre la superficie del electrodo de trabajo de un sistema electródico serigrafiado, y su posterior oxidación en presencia de dichos haluros. Además, para observar y verificar los procesos electroquímicos que están teniendo lugar, se realiza un estudio espectroelectroquímico.

La reproducibilidad de los sensores desarrollados es inferior o igual al 4 % y presentan un límite de detección de 3.0 μM para el ion cloruro, y 5.0 μM , en el caso del bromuro y yoduro.

Debido a la importancia de conocer de forma rápida y temprana la concentración de cloruro en el sudor para el diagnóstico de la fibrosis quística, el método desarrollado ha sido transferido con éxito usando Gore-Tex® como sustrato en el sensor, para monitorizar de forma continua la cantidad de ion cloruro en el sudor.

Este trabajo se encuentra actualmente en trámite de publicación en *Sensors and Actuators B*.

6.1 Introduction

Halide ions are present in a number of industrial, medical, and environmental processes, playing in most cases an essential role. Therefore, the selective determination of halides ions is significant for monitoring both excessive and deficient concentration levels in natural resources, which can result in different types of pollution and, even, of physiological disorders. For example, cystic fibrosis, acid–base disorders and blood pressure [1, 2]. Cystic fibrosis (CF) is a common chronic disease whose symptoms are related to a high level of chloride in sweat. Thus, the best laboratory test for the diagnosis of CF, along with a genetic analysis [3, 4] is considered the chloride measurement in sweat (sweat test).

A number of strategies have been proposed for the determination of halide ions in the environment or in physiological systems, including ion chromatography [5-7], coulometric titrations [8] and spectrometry by artificial chromophore and fluorophore [9].

Electrochemical analysis also presents a favorable scenario for determining halide ions in biological samples [10]. The most frequently used potentiometric methods have been those based on ion selective electrodes [1, 11-19].

In recent years, the substitution of traditional electrodes by new disposable screen–printed electrodes (SPEs) has emerged an interesting alternative for these determinations with many advantages, such as high sensitivity and selectivity, simplicity and lower costs, as well as the possibility of performing “in situ” analysis.

The use of this kind of sensors has been hardly found in the literature to halide ions determination in biological samples [4, 20–22]. In addition, electrochemical screen-printed sensors can be considered as promising wearable chemical sensors suitable for diverse applications owing to their high performance, inherent miniaturization and low cost [23].

Medical interest for on-body wearable systems arises from the need to monitor patients over long periods of time. As a result, there has been a significant increase in sweat analysis in recent years because is non-invasive monitoring of fluids and electrolytes loss by elite athletes during sport events (rehydration optimization) [24]. These kind of sensors can be used to improved clinical management of certain pathologies such as CF, where monitoring pH, chloride and sodium ion concentration can provide valuable information about this disease [25].

In a previous work, it has been proven that some textile such as Gore-Tex®, is suitable as electrodic support to developed screen printed sensors. In fact, a disposable sensor was developed to determine chloride ion [26]. The namely sensor is based on a completely different approach than the sensor proposed in this work. Thus, in our previous work the Nernstian shift of the voltammetric peak of a control compound, such as ferrocenemethanol, is measured to determine chloride ions, but the sensitivity was rather poor in comparison with the new methodology. Now, we introduce the development of a more sensitive disposable Gore-Tex® sensor based on the oxidation of silver nanoparticles in presence of chloride ions, which takes into account the strong interaction of chloride and silver ions. Regarding chloride determination in sweat samples, to the best of our knowledge, no wearable sensors

have been previously described, and therefore, the proposed device could be considered as a first approach to a wearable sensor to determine the chloride ion concentration in synthetic sweat samples. After some modifications, the new sensor could be applied to obtain an early diagnosis of CF disease in a near future.

Moreover, in order to better understand the electrochemical process, a deeper study of the electrochemical behavior of different halide compounds was carried out using carbon working electrodes (SPCEs) modified with silver nanoparticles (AgNPs). In addition, a spectroelectrochemical study was performed to shed more light on the electrochemical processes that take place during the detection of halides [27], as well as on the influence of the backing material, PET or Gore-Tex®, where the electrode system is printed.

6.2 Experimental

6.2.1 Reagents and solutions

All the chemicals were of analytical grade and were used as received without further purification. High-quality water (Milli Q A10 system, Millipore, Bedford, USA) was employed for preparing all solutions.

KCl was provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). KBr, KI, KNO₃, AgNO₃, L-histidine monohydrochloride monohydrate and sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). NaCl and NaOH were supplied from Panreac (Barcelona, Spain).

Synthetic sweat sample was prepared following AENOR normative (UNE-EN-ISO 105-B07:2009) according to ISO 105-04 which had a sodium chloride concentration of 5 g L^{-1} (0.085M), 0.5 g L^{-1} of L-histidine monohydrochloride monohydrate and 2.2 g L^{-1} of sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate in the sample. This sample was diluted and it was tuned up to pH 5.5 with 0.1 M sodium hydroxide solution.

C10903P14 (carbon ink) and D2071120D1 (dielectric ink) were purchased from Gwent Electronic Materials (Torfaen, U.K). Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) and Electrodag 418 (Ag ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

3-Layer Gore-Tex® laminate Waterproof Breathable Ripstop Nylon Fabric was supplied by Rockywoods (Loveland, USA).

6.2.2 Apparatus

Electrochemical measurements were performed with a μ Autolab electrochemical system with GPES software package to control the instrument, register and perform the analysis of results (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands).

Spectroelectrochemical experiments were carried out using a PGSTAT 302N potentiostat (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) coupled to a QE65000 Spectrometer (Ocean Optics, Florida, USA). The light beam, supplied by a DH-2000 Deuterium-halogen light source (Ocean Optics, Florida, USA), was both guided to,

and collected from, the working electrode surface of the SPCEs by a reflection probe (FCR-7UV200-2-1.5X1SR, Avantes, Apeldoorn, The Netherlands).

6.2.3 Sensor manufacturing

Home-made SPEs, used in this work, consist of a carbon working electrode (area, 12.56 mm²), a carbon counter electrode and a silver/silver chloride as a pseudo-reference electrode (PRE). Carbon ink was used in conductive paths of SPEs. These electrodes were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyethylene terephthalate (PET) of 500 µm thickness and Gore-Tex® as supports, according to the procedure described elsewhere [28]. Both supports were pre-heated to 120°C for 1 hour before the printing process.

6.2.4 Silver nanoparticles modified SPCEs preparation and characterization

The working electrode surface was electrochemically modified with AgNPs. The deposition of AgNPs was performed in a 100 µL drop of 10⁻⁴ M AgNO₃ prepared in Britton Robinson buffer, pH 2, by chronoamperometry, applying a potential of -1.20 V vs screen-printed Ag/AgCl electrode during 20 s. After the electrodeposition process, AgNPs modified SPCEs (AgNPs-SPEs) were washed with Milli-Q water. This electrodeposition procedure has been previously published and images of the AgNPs modified electrode can be seen in [29].

6.2.5 Voltammetry measurements

Linear sweep voltammetry (LSV) experiments were recorded from -0.40 V to 0.60 V, in a drop sample placed onto the surface of the electrode system.

The sample droplet contains chloride, bromide or iodide ions and 0.01 M of KNO_3 as a supporting electrolyte. The scan rate was 10 mV s^{-1} and the step potential was 5 mV .

6.2.6 Spectroelectrochemical measurements

Spectroelectrochemical experiments were performed in a near-normal reflection arrangement. For this purpose, a reflection probe was placed in the drop perpendicular to the electrode surface for the spectroscopic measures. This optical configuration allows us to follow the spectroscopic changes that take place during the electrochemical experiments that have been performed in a $100 \mu\text{L}$ drop containing chloride ion and KNO_3 using the same parameters than in the LSV experiments.

6.3 Results and discussion

The electrochemical deposition of AgNPs is very useful to determine halides because the oxidation of AgNPs, according with the procedure described above in 6.2.4, can be used to generate silver halides on the electrode surface. Thus, in this work, the working SPCE was modified with AgNPs in order to develop a sensor that allows us the sensitive determination of halide ions in solution.

When halide ions are not present in the sample, a single voltammetric peak was obtained due to the oxidation from AgNPs to silver (I) ions. However, in presence of halides, two overlapped voltammetric peaks were obtained, the first one due to silver halides formation on the electrode surface, and the second one due to oxidation from AgNPs to silver cations [4].

There is a different trend in the interaction between silver cations and different halides ions. In fact, the oxidation of the different silver halides performed by linear voltammetry suffers a potential shifting to positive values according to the electronegativity of the halides. The higher electronegativity of the halide, the higher ionic character has the molecule bond, and in consequence, the higher solubility. This relationship is given by the solubility product constant (Ksp). Ksp values of silver chloride, silver bromide and silver iodide are $1.8 \cdot 10^{-10}$, $5.0 \cdot 10^{-13}$ and $8.3 \cdot 10^{-17} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$, respectively. Therefore, the smaller Ksp, the stronger the interaction between the silver and the halide. In consequence, as can be seen in Figure 6.1, anodic voltammetric peaks of the different halides emerge at higher overpotentials for the highest soluble silver halide: -0.18 V for the silver iodide, at +0.05 V for silver bromide, and at +0.10 V for silver chloride (Figure 6.1), confirming the different trend of chloride, bromide and iodide to form silver halides.

Moreover, Figure 6.1 shows that the second oxidation peak in the overlapped signal, which is related to the oxidation of AgNPs to silver(I), exhibits different height depending on the studied halide. In the case of silver chloride, the most soluble halide, the height of the second peak is the highest compared to those of the other halides. This fact can be related to the solubility product constant.

Thus, the higher K_{sp} , the higher current peak of the second process that is related to the oxidation of the nanoparticles. This result is consistent with the higher solubility of silver chloride regarding the other silver halides, because in a chloride medium a larger amount of $Ag(I)$ in solution exists. In fact, when the halide concentration increases, this second anodic peak becomes smaller. It is also remarkable that the difference of potential between the first and the second oxidation processes depends on the halide present in solution. Thus, the lower the solubility product constant, the higher oxidation peak potential difference between the two oxidation processes.

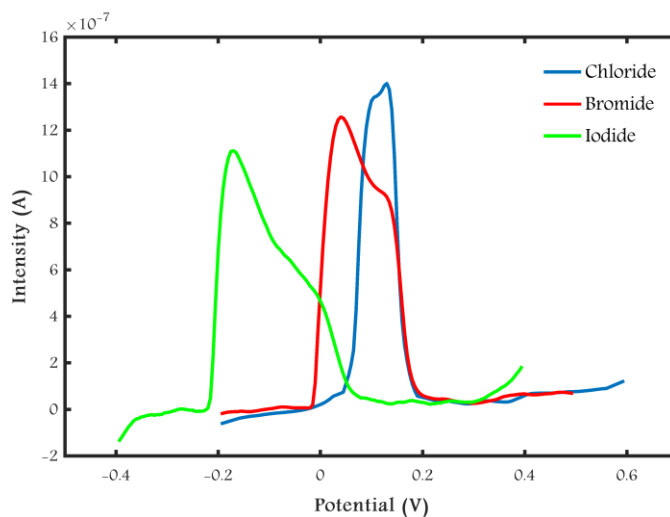


Figure 6.1. Linear sweep voltammograms recorded from -0.40 to 0.60 V in 0.01 M of KNO_3 in presence of 80 μM of iodide ion (green line), bromide ion (red line) or chloride ion (blue line). Scan rate=10 $mV s^{-1}$. Electrode system printed in PET support.

6.3.1 Chloride effect studied by UV/Vis absorption spectroelectrochemistry using a PET sensor

A UV/Vis absorptometric spectroelectrochemistry study was carried out, in order to obtain a better understanding on the electrochemical process described above. The effect of chloride was taken as an example of the processes studied above. Spectroelectrochemistry is a valuable tool to obtain more complete information about the changes on the electrode surface, both during the nanoparticles formation and during the redissolution process. In this way, the electrochemical signal is completely related to the evolution of the absorbance bands in the UV/Vis spectra.

First, the modification of SPCEs with AgNPs was followed by UV/Vis absorption spectroelectrochemistry in a near-normal arrangement. Figure 6.2 shows the spectra evolution obtained concomitantly with AgNPs electrochemical deposition. During the first 4 s an almost flat band is observed, that can be related to the generation of small clusters in the beginning of the experiment. This band evolves to the typical AgNPs plasmon band, centered at 420 nm, related to the polydispersed AgNPs [30].

This band evolves to the typical AgNPs plasmon band, centered at 420 nm, related to the generation of polydispersed AgNPs [30]. Concomitantly a band at 380 nm decreases, related to the consumption of silver cations by reduction to Ag(0).

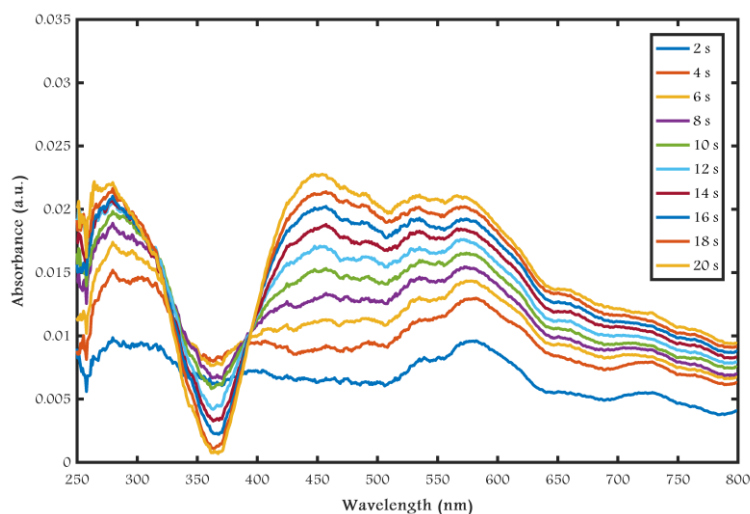


Figure 6.2: Spectra evolution during AgNPs generation applying -1.20 V vs Ag/AgCl SPE during 20 s in a solution 10^{-4} M AgNO_3 , prepared in Britton Robinson buffer pH 2. Scan rate= $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Electrode system printed in PET support.

Once AgNPs are deposited on the electrode surface, a linear sweep voltammogram was performed from -0.20 V to $+0.50$ V at $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, using a solution containing chloride ions. Figure 6.3 shows the spectra between 250 and 800 nm registered during this electrochemical experiment, selecting some significant potentials and taking the AgNPs spectrum as reference spectrum. Each UV/Vis spectrum was taken for 200 ms. Two absorbance bands evolve during the experiment, one centered at 385 nm and the other centered at 550 nm. We can rationalize these bands in terms of two phenomena: 1) generation of silver chloride on the AgNPs surface and 2) oxidation of AgNPs to generate Ag(I). The voltabsorptograms at these two significant wavelengths, 385 and 550 nm, plotted together with the LSV indicated that the optical signal fully deconvolves the electrochemical process (Figure 6.4).

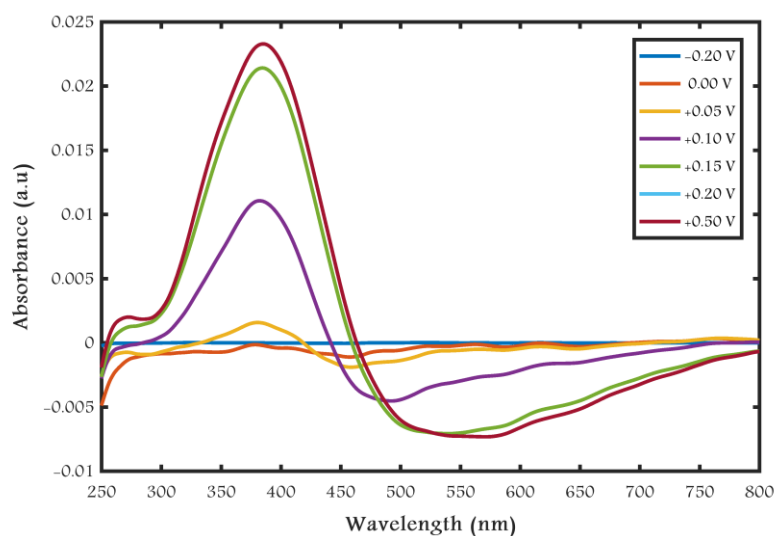


Figure 6.3. UV-Visible spectra registered spectra between 250 and 800 nm registered during LSV experiment.

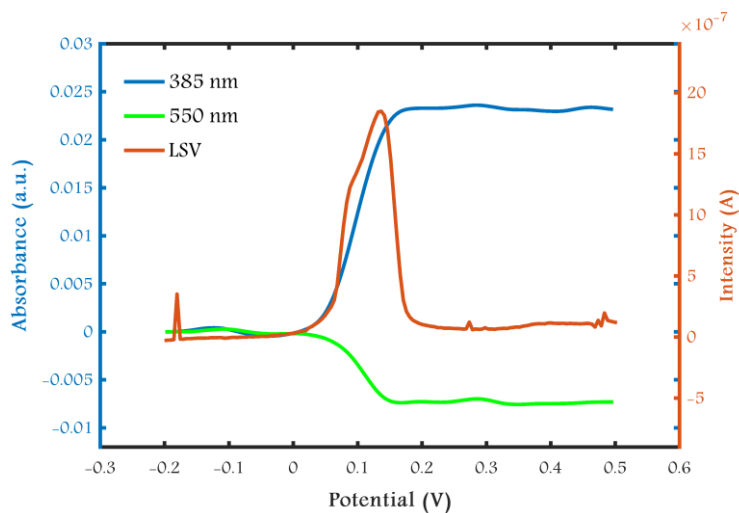


Figure 6.4. Comparison of the voltabsorptograms at 385 nm (blue line) and at 550 nm (green line) with the LSV. Experiment performed in 0.01 M of KNO₃ in presence of 30 μM of chloride ion. Initial potential (E_i)=-0.20 V, final potential (E_f)=-0.50 V. Scan rate 0.01 V·s⁻¹. Electrode system printed in PET support.

The absorbance at 385 nm starts to increase concomitantly with the first oxidation peak in the LSV, indicating the formation of the AgCl on the NPs surface. Absorbance at this wavelength achieves a constant value after this first oxidation peak, suggesting that AgCl has covered the AgNPs surface. However, absorbance at 550 nm decreases at potentials related to the second overlapped oxidation peak, indicating the reoxidation of the AgNPs electrodeposited on the carbon electrode surface, process that occurs at higher potentials.

Thus, the optical signal confirms that first silver cations generated during the oxidation of the AgNPs precipitate instantaneously as silver chloride due to the chloride present in the solution, and once it is covered by AgCl the redissolution of the nanoparticles occurs.

6.3.2 Spectroelectrochemistry measurements using Gore-Tex® sensors

In a previous study [26], it was proved the good properties of Gore-Tex® as substrate of SPEs, but the possibility of electrodepositing AgNPs by using this backing support, was not explored. Thereby, Gore-Tex® electrochemical sensors have been developed by depositing AgNPs onto the working electrode surface, performing LSV in order to determine the chloride concentration following the procedure described above. To carry out a more complete study of the Gore-Tex® sensors, UV/Vis absorption spectroelectrochemistry measurements were performed. For this purpose, the same experiments performed in the PET substrate were carried out in the Gore-Tex® substrate. The UV/Vis absorption spectra obtained during the AgNPs electrodeposition on the wearable sensor is very similar to the shape shows in Figure

6.2 registered on a SPE on PET. However, the absorbance values are lower indicating that a lower amount of AgNPs was electrodeposited.

Here, LSV experiments were carried out from -0.20 V to $+0.50$ V at 0.01 V s⁻¹ where the spectroscopic signal was concomitantly obtained. The voltammogram, as in the case of the AgNPs synthesis, shows a similar behavior than the one performed on the PET sensor exhibiting the same peak potential, confirming that the backing material where the electrode system is printed does not modified the electrochemical signal. However, the spectroscopic signal of the wearable sensor is affected by the roughness of the backing material since Gore-Tex® surface is rougher than PET surface.

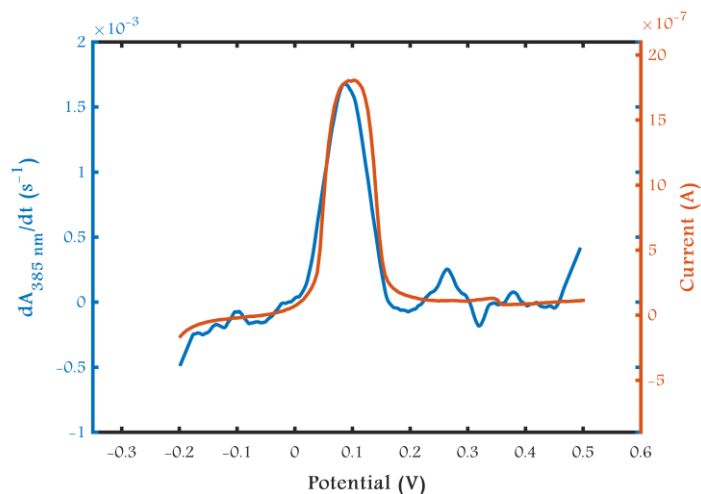


Figure 6.5: Comparison between derivative voltabsorptogram at 385 nm and linear sweep voltammogram Experiment performed in 0.01 M of KNO₃ in presence of 30 μ M of chloride ion. Initial potential (E_i) = -0.20 V, final potential (E_f) = -0.50 V. Scan rate 0.01 V·s⁻¹. Electrode system printed in Gore-Tex support.

Moreover, Figure 6.5 shows the derivative voltabsorptogram at 385 nm together with the LSV. The similarity of the two responses undoubtedly indicates that the spectroscopic signal is completely related to the oxidation process observed in the LSV. However, the sensitivity of the process is higher for the electrochemical signal that should lead to a better limit of detection, allowing us to develop a Gore-Tex® electrochemical sensor that could be used as a wearable sensor for halides.

6.3.3 Electrochemical determination of halide ions using PET sensors

Following the procedure described above, once AgNPs were electrodeposited onto the working electrode surface, the electrochemical sensor was ready to determine the concentration of the halide in solution by LSV.

The concentration of the halides in the solution is related to the silver halides formed on the electrode surface. A linear relationship between the height of the first anodic peak and the halide concentrations was found, allowing us to quantify the halide ions. Calibration curves were built, by taking the average of 5 measurements for each concentration, in the calibration range showed in Table 6.1.

In order to characterize the analytical method, the reproducibility was calculated taking into account the relative standard deviation (RSD) of the slopes of the five calibration curves registered using different sensors. Outliers were detected by using PROGRESS program [31], which uses an algorithm based on a least median square (LMS) regression. Once, these outliers points were removed from the calibration set, ordinary least square (OLS) regressions were built with the remaining points. Sensitivity values, obtained from the slope of the regression are shown in

Table 6.1, as well as, the good reproducibility of the method supported by the RSD values obtained.

Additionally, the detection limit of the proposed analytical method was obtained for a given probability of false positive (a) and negative (b) of 0.05 [32, 33]. The minimum detectable concentration of each halide is shown in Table 6.1. In all cases, these values were below the lowest calibration standard values. Thus, these last ones were taken as average detection limits from an analytical point of view.

Calibration range depends on the amount of AgNPs present in the electrode. They could be extended to higher halide concentrations by either, increasing the concentration of the AgNO₃ solution, or deposition time on the procedure of immobilizing AgNPs in the electrode described in section 6.2.4.

Table 6.1: Calibration parameters obtained for the determination of halide by LSV in 0.01 M of KNO₃ solution.

Halide	Calibration range	Sensitivity	RSD %(n=5)	Computed limit of detection	Experimental limit of detection
Cl⁻	3.0 10 ⁻⁶ – 1.0 10 ⁻⁴ M	0.0196 A M ⁻¹	1.93	2.25·10 ⁻⁶	3.0 10 ⁻⁶
Br⁻	5.0 10 ⁻⁶ – 0.8 10 ⁻⁴ M	0.0141 A M ⁻¹	3.27	4.34·10 ⁻⁶	5.0 10 ⁻⁶
I⁻	5.0 10 ⁻⁶ – 0.8 10 ⁻⁴ M	0.0111 A M ⁻¹	3.21	4.76·10 ⁻⁶	5.0 10 ⁻⁶

6.3.4. Determination of chloride ions using a Gore-Tex® electrochemical sensor

As in the PET substrate sensors, once the Gore-Tex® sensors were modified with AgNPs, 100 mL drops of sample with different concentrations of chloride ion were placed onto the electrode surface and LSV was performed. A linear relationship between the height of the first oxidation peak and the chloride ions concentration was obtained. The slope value of this regression was $0.025 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$. Precision was calculated, in the same way as at PET sensors, obtaining a RSD value of 3.87 % (n=5). The parameters of the validated linear regressions were used to estimate the detection limit of these sensors for a given probability of false positive (a) and negative (b) of 0.05 [32, 33]. The minimum detectable concentration computed was $0.17 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Since this value is below the lowest calibration standard, $0.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, the latter was taken as average detection limit from an analytical perspective.

6.3.5 Application to synthetic sweat sample

In order to check the performance of the chloride sensors, a synthetic sweat sample was analyzed by using both PET and Gore-Tex® as substrates of the sensors. Chloride concentrations, expressed in mol L^{-1} were calculated from the built calibration curves.

The synthetic sweat sample was diluted to a chloride value of $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ by mixing 6 μL of synthetic sweat with deionized water and fixing the pH at a value of 5.5 with 0.1 M sodium hydroxide solution.

The height of the oxidation peak obtained for the diluted sample were introduced in the previously built calibration curves (Section 6.3.3 and 6.3.4) and the chloride concentration for diluted synthetic sweat sample, expressed in mol L⁻¹, was calculated from the corresponding linear regressions. So, the chloride concentration detected was 0.0858±0.0003 M (n=3, 95% confidence interval for mean), in case of using the PET sensor, and 0.086±0.002, when the Gore-[®]Tex sensor was used. The detected values are in good agreement with the value of chloride content in sweat samples (0.085 M). Therefore, from the obtained results we conclude that the developed method is both precise and suitable for the analysis of chloride ions.

6.4 Conclusions

Given the relevance of wearable electrochemical sensors, a Gore-[®]Tex screen printed voltammetric sensor has been developed for the determination of chloride ions, by modifying the working electrode with AgNPs. The selectivity of the sensor, which also showed excellent reproducibility (RSD=3.86%), makes it an appropriate option for monitoring the chloride concentration in sweat.

The development of this new sweat test based on a low cost, non-invasive, easy to operate and wearable sensor could be of great importance in order to obtain an early diagnosis of, for instance, cystic fibrosis. This first approach of a wearable electrochemical sensor is flexible, comfortable, and biocompatible. Therefore, it could be made commercially available for continuous health monitoring through

contact with the human body. Moreover, the presence of AgNPs in this sensor, gives it antimicrobial properties.

The spectroelectrochemistry technique has helped to confirm the processes involved in both the AgNPs generation and the reoxidation of silver in the presence of halides.

6.5 References

- [1] F. Faridbod, M.R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, Developments in the field of conducting and non-conducting polymer based potentiometric membrane sensors for ions over the past decade, *Sensors* 8(4) (2008) 2331-2412.
- [2] F. Qu, N.B. Li, H.Q. Luo, Polyethyleneimine-Templated Ag Nanoclusters: A New Fluorescent and Colorimetric Platform for Sensitive and Selective Sensing Halide Ions and High Disturbance-Tolerant Recognitions of Iodide and Bromide in Coexistence with Chloride under Condition of High Ionic Strength, *Analytical Chemistry* 84(23) (2012) 10373-10379.
- [3] J. Gonzalo-Ruiz, R. Mas, C. de Haro, E. Cabruja, R. Camero, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz, Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat, *Biosensors and Bioelectronics* 24(6) (2009) 1788-1791.
- [4] H.S. Toh, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R.G. Compton, Electrochemical detection of chloride levels in sweat using silver nanoparticles: A basis for the preliminary screening for cystic fibrosis, *Analyst* 138(15) (2013) 4292-4297.
- [5] C. Villagrán, M. Deetlefs, W.R. Pitner, C. Hardacre, Quantification of Halide in Ionic Liquids Using Ion Chromatography, *Analytical Chemistry* 76(7) (2004) 2118-2123.
- [6] F. Hao, P.R. Haddad, T. Ruther, IC determination of halide impurities in ionic liquids, *Chromatographia* 67(5-6) (2008) 495-498.
- [7] T.K. Malongo, S. Patris, P. Macours, F. Cotton, J. Nsangu, J.M. Kauffmann, Highly sensitive determination of iodide by ion chromatography with amperometric detection at a silver-based carbon paste electrode, *Talanta* 76(3) (2008) 540-547.
- [8] E. Cotlove, H.H. Nishi, Automatic titration with direct read-out of chloride concentration, *Clinical chemistry* 7 (1961) 285-291.

- [9] L.C. Gilday, N.G. White, P.D. Beer, Triazole- and triazolium-containing porphyrin-cages for optical anion sensing, *Dalton Transactions* 41(23) (2012) 7092–7097.
- [10] K. Arai, F. Kusu, N. Noguchi, K. Takamura, H. Osawa, Selective determination of chloride and bromide ions in serum by cyclic voltammetry, *Analytical Biochemistry* 240(1) (1996) 109–113.
- [11] J.N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R.K. Mahajan, R.K. Puri, A chloride selective sensor based on a calix[4]arene possessing a urea moiety, *Tetrahedron Letters* 49(17) (2008) 2772–2775.
- [12] B.J. Sucman E., Determination of chlorides in foods using ion-selective electrodes. A review, *Canadian journal of analytical sciences and spectroscopy* 47 (2002) 5.
- [13] K.G. Kumar, K.S. John, C.J. Indira, A chloride ion-selective potentiometric sensor based on a polymeric Schiff base complex, *Indian Journal of Chemical Technology* 13(1) (2006) 13–16.
- [14] E. Bakker, Y. Qin, Electrochemical sensors, *Analytical Chemistry* 78(12) (2006) 3965–3983.
- [15] V.K. Gupta, Potentiometric sensors for inorganic anions based on neutral carriers, *Arab. J. Sci. Eng.* 35(2A) (2009) 7–25.
- [16] W.J. Warwick, L. Hansen, Measurement of chloride in sweat with the chloride-selective electrode, *Clinical Chemistry* 24(11) (1978) 2050–2053.
- [17] A.W.M. Sweetsur, An ion-selective electrode method for the determination of chloride in milk, *The Analyst* 99(1183) (1974) 690–692.
- [18] T.V. Shishkanova, D. Sýkora, J.L. Sessler, V. Král, Potentiometric response and mechanism of anionic recognition of heterocalixarene-based ion selective electrodes, *Analytica Chimica Acta* 587(2) (2007) 247–253.
- [19] C.Y. Cheng, Z.M. Huang, W.Y. Chung, D.G. Pijanowska, M. Dawgul, Development of Polymeric Resin Ion-exchanger Based Chloride Ion-selective Electrode for Monitoring Chloride Ion in Environmental Water, *Journal of the Chinese Chemical Society* 59(1) (2012) 122–131.

- [20] G. Colovos, G.S. Wilson, J.L. Moyers, Simultaneous determination of bromide and chloride by cathodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry* 46(8) (1974) 1051-1054.
- [21] I. Shain, S.P. Perone, Application of stripping analysis to the determination of iodide with silver microelectrodes, *Analytical Chemistry* 33(3) (1961) 325-329.
- [22] M.H. Chiu, W.L. Cheng, G. Muthuraman, C.T. Hsu, H.H. Chung, J.M. Zen, A disposable screen-printed silver strip sensor for single drop analysis of halide in biological samples, *Biosensors and Bioelectronics* 24(10) (2009) 3008-3013.
- [23] J.R. Windmiller, J. Wang, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis* 25(1) (2012) 29-46.
- [24] R.M. Morgan, M.J. Patterson, M.A. Nimmo, Acute effects of dehydration on sweat composition in men during prolonged exercise in the heat, *Acta Physiologica Scandinavica* 182(1) (2004) 37-43.
- [25] G. Matzeu, L. Florea, D. Diamond, Advances in wearable chemical sensor design for monitoring biological fluids, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 211 (2015) 403-418.
- [26] J. Bujes-Garrido, M.J. Arcos-Martínez, Development of a wearable electrochemical sensor for voltammetric determination of chloride ions, *Sensors and Actuators B: Chemical* 240 (2017) 224-228.
- [27] T. Kuwana, Electrochemical studies using conducting glass indicator electrodes, *Analytical Chemistry* 36(10) (1964) 2023-2025.
- [28] M.A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers, *Analytica Chimica Acta*, 633(2009) 51-56.
- [29] O. Domínguez, M.J.A. Martínez, A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes, *Electrochemistry Communications*, 9(2007) 820-826.

[30] S.W. Lee, S.H. Chang, Y.S. Lai, C.C. Lin, C.M. Tsai, Y.C. Lee, J.C. Chen, C.L. Huang, Effect of temperature on the growth of silver nanoparticles using plasmon-mediated method under the irradiation of green LEDs, *Materials* 7(12) (2014) 7781-7798.

[31] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, (1989).

[32] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Geléncsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed., Port City Press Inc, Baltimore, (2000).

[33] ISO11843, *Capability of detection* Genève, Switzerland, Part I (1997) and Part II (2000).

7. CONCLUSIONES

De los resultados de los capítulos precedentes se extraen las siguientes conclusiones:

- 1.- La versatilidad de la tecnología serigráfica permite la fabricación de sistemas electródicos serigrafiados en diferentes sustratos susceptibles de actuar como transductores en sensores electroquímicos. Estos dispositivos han demostrado su viabilidad para monitorizar reacciones electroquímicas con buena sensibilidad, adaptándose a las necesidades de cada análisis.
- 2.- Cuando se utiliza un sistema electródico serigrafiado compuesto por un electrodo de pseudo referencia de Ag/AgCl, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de carbono, la existencia de especies que forman compuestos insolubles con la plata o con el cloruro producen un desplazamiento o deformación del pico voltamperométrico de las especies electroactivas que se encuentren en disolución.
- 3.- El desplazamiento o deformación del pico voltamperométrico es sistemático cuando se utilizan vías de carbono en la construcción del sistema electródico.
- 4.- En una experiencia voltamperométrica, en la que se utiliza un electrodo serigrafiado de referencia de Ag/AgCl (electrodo de pseudo referencia PRE), su potencial de equilibrio, se ve afectado por la presencia de ion cloruro. Este hecho permite determinar la concentración de dicho ion mediante la medida del desplazamiento del potencial del pico voltamperométrico de una especie electroactiva presente en la disolución, con sucesivas adiciones de ion cloruro.

- 5.- El desplazamiento del potencial del pico voltamperométrico de las especies electroactivas (FeMeOH , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) presenta una relación lineal con el logaritmo de la concentración del ion cloruro del medio. En el caso del FeMeOH , la relación entre el potencial del pico de oxidación de esta especie y la concentración de cloruro sigue un comportamiento nernstiano.
- 6.- Es posible llevar a cabo la determinación voltamperométrica de iones cloruro utilizando SPEs efectuando un barrido de potencial desde -0.4 V a $+0.8 \text{ V}$ vs $\text{AgCl}/\text{AgCl PRE}$, sobre una disolución que contiene FeMeOH o $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y desde $+0.8$ a -0.4 V vs $\text{AgCl}/\text{AgCl PRE}$, cuando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ es la especie electroactiva en disolución.
- 7.- En la determinación de cloruros mediante voltamperometría diferencial de impulsos, la utilización de FeMeOH como especie de control proporciona mayor selectividad al método que cuando se utiliza $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.
- 8.- El método desarrollado para determinación voltamperométrica de cloruro utilizando FeMeOH , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como especies de control en disolución, muestra unos valores de reproducibilidad y de repetibilidad inferiores o iguales al 3% en términos de los RSD de las pendientes asociadas a las respectivas rectas de calibración.
- 9.- El método desarrollado para determinación voltamperométrica de cloruro utilizando FeMeOH , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como especies de control en disolución, presenta unos rangos de calibración comprendidos entre 10 mM y 100 mM , 200 mM y 900 mM y de 200 mM a 900 mM respectivamente.

- 10.- La modificación del electrodo de trabajo con FeMeOH y $K_4[Fe(CN)_6]$, mezclando tintas de carbono con estas especies, ha permitido la impresión directa de la especie de control y posibilita la cuantificación voltamperométrica del ion cloruro sin añadir una especie electroactiva a la disolución.
- 11.- Los sensores basados en la utilización de $SPC_{FeMeOH}ES$ y $(SPC_{K_4[Fe(CN)_6]}ES)$, permiten la cuantificación del ion cloruro de forma muy simple y directa, con una reproducibilidad y repetibilidad inferior al 3% en términos de los RSDs de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración de 70 mM a 600 mM y de 200 mM a 800 mM respectivamente.
- 12.- La medida del desplazamiento sufrido por el pico voltamperométrico de oxidación del FeMeOH, cuando el ion cloruro está presente en una disolución, utilizando un sistema electródico serigrafiado, ha demostrado ser una forma rápida y económica de determinar la concentración de cloruro en agua de mar y en una muestra de solución salina comercial.
- 13.- Los valores obtenidos por voltamperometría diferencial de impulsos en la determinación de cloruro en agua de mar y en muestras de solución salina comercial, son acordes con los hallados por potenciometría utilizando ISE, lo que demuestra la validez del método propuesto.

- 14.- El Gore-Tex® presenta excelentes propiedades como soporte o sustrato en sistemas electródicos serigrafiados debido a su hidrofobicidad y su buen comportamiento electroquímico.
- 15.- El sensor serigrafiado desarrollado, utilizando vías de carbono y compuesto por un electrodo de pseudo referencia de Ag/AgCl, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de carbono impresos sobre Gore-Tex®, permite la determinación de cloruro mediante voltamperometría diferencial de impulsos llevando a cabo un barrido de potencial desde -0.4 V a +0.8 V vs AgCl/AgCl PRE, utilizando FeMeOH como especie de control y K₂SO₄ como electrolito soporte.
- 16.- En el sensor de Gore-Tex® desarrollado, el desplazamiento del potencial del pico voltamperométrico de oxidación del FeMeOH presenta una relación lineal con el logaritmo de la concentración de iones cloruro en el medio, siguiendo un comportamiento muy similar al teórico de la ecuación de Nernst.
- 17.- El “wearable sensor” desarrollado muestra una reproducibilidad de 2.47% y una repetibilidad de 2.65% en términos de los RSDs de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración de 0.2 mM a 0.7 mM y un límite de detección de 0.2 mM.
- 18.- El sensor de Gore-Tex® ha demostrado su viabilidad para realizar análisis cuantitativos del ion cloruro en muestras de agua de mar.

- 19.- Las condiciones óptimas para depositar electroquímicamente AgNPs sobre la superficie de un sistema electródico serigrafado formado por un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de carbono, y un electrodo de referencia de Ag/AgCl se consiguieron mediante cronoamperometría aplicando un potencial de -0.12 V vs Ag/AgCl durante 20 s en una gota de disolución 0.1 mM de AgNO₃ en tampón Britton–Robinson pH 2.
- 20.- El sensor obtenido modificando el electrodo de trabajo con AgNPs (AgNPs–SPCEs), permite la determinación de haluros mediante voltamperometría lineal llevando a cabo un barrido de potencial desde -0.4 V a 0.6 V vs AgCl/AgCl PRE sobre una gota de disolución, conteniendo el haluro, depositada en la superficie electródica.
- 21.- La oxidación de las AgNPs para formar los diferentes haluros de plata mediante voltamperometría lineal utilizando AgNPS–SPCEs, sufre un desplazamiento anódico relacionado con la solubilidad de los diferentes haluros de plata. El pico de oxidación de las AgNPs depositadas en la superficie electródica, se desplaza desde -0.18 V a $+0.05$ V hasta $+0.1$ V dependiendo de la presencia de yoduro, bromuro o cloruro en el medio.
- 22.- El sensor obtenido, mediante la modificación del electrodo de trabajo con AgNPs, para la determinación de cloruro muestra una reproducibilidad del 2.60%, en términos del RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración en el intervalo de concentración comprendido entre $3.0 \cdot 10^{-3}$ y $10 \cdot 10^{-1}$ mM. El límite de detección es de $3.0 \cdot 10^{-3}$ mM.

- 23.- El sensor obtenido para la determinación de bromuro mediante la modificación del electrodo de trabajo con AgNPs presenta una reproducibilidad del 3.15%, en términos del RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración en el intervalo de concentración comprendido entre $5.0 \cdot 10^{-3}$ y $0.8 \cdot 10^{-1}$ mM. Su límite de detección es de $5.0 \cdot 10^{-3}$ mM.
- 24.- El sensor obtenido mediante la modificación del electrodo de trabajo con AgNPs muestra una reproducibilidad del 4.14%, en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración en el intervalo de concentración comprendido entre $5.0 \cdot 10^{-3}$ y $0.8 \cdot 10^{-1}$ mM para la determinación de yoduro. Su límite de detección es de $5.0 \cdot 10^{-6}$ mM.
- 25.- El sensor basado en la utilización de AgNPs-SPCE en sustrato Gore-Tex®, muestra una reproducibilidad de 3.87 % (n=5) en términos del RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración comprendido entre $0.2 \cdot 10^{-1}$ y $0.7 \cdot 10^{-1}$ mM. Su límite de detección es de $0.2 \cdot 10^{-1}$ mM.
- 26.- Los sensores basados en la utilización de AgNPs-SPCE, impresos tanto en sustratos de PET como en Gore-Tex®, han demostrado su viabilidad para realizar análisis cuantitativos de cloruro en muestras de sudor sintético, por lo que podrían usarse para el diagnóstico de la CF.

- 27.- La banda plasmónica característica de la plata observada a 420 nm utilizando espectroelectroquímica, ha permitido verificar la electrodeposición de las AgNPs en la superficie electródica tanto utilizando sustratos de PET como de Gore-Tex®.
- 28.- La espectroelectroquímica ha mostrado su utilidad en la verificación del comportamiento electroquímico de las AgNPs depositadas en la superficie del electrodo al someterlas a un proceso de oxidación voltamperométrica en presencia de haluros.