



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**Departamento de Química**

**Área de Química Analítica**

**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y  
UTILIZACIÓN CON FINES ANALÍTICOS DE  
ELECTRODOS MODIFICADOS CON  
NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO SOBRE  
SOPORTE DE NANOESTRUCTURAS DE  
CARBONO**

Memoria presentada por

**ANA ERICA PÁRAMO MARTÍN**

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Burgos

Directora:

**Susana Palmero Díaz**

Mayo, 2017





UNIVERSIDAD DE BURGOS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Dña. Susana Palmero Díaz, profesor contratado doctor  
del Área de Química Analítica de la Universidad de  
Burgos**

HACE CONSTAR:

Que la presente memoria resume el trabajo titulado **“DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y UTILIZACIÓN CON FINES ANALÍTICOS DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO SOBRE SOPORTE DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO”** realizada en el Área de Química Analítica por Dña. Ana Erica Páramo Martín y bajo mi dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Burgos.

Manifiesto mi conformidad con el contenido de la memoria y autorizo su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Burgos, 25 de Mayo de 2017

Fdo.: Susana Palmero Díaz



## *A mi familia*

*“Hay magia cuando sigues luchando más allá de tu  
resistencia. La magia de darlo todo por un sueño que nadie  
más ve a parte de ti”*

*Million Dollar Baby*



# *Agradecimientos*

*Este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, enseñándome, dando ánimo, ... por ello, me valgo de estas líneas para expresarles mi más sentido agradecimiento.*

*Debo agradecer de manera muy especial y sincera a la Dra. Susana Palmero por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Por su orientación y supervisión, pero sobre todo por la motivación y apoyo recibido a lo largo de los años.*

*A los profesores, la Dra. Aránzazu Heras y el Dr. Álvaro Colina por sus aportes y sugerencias a esta tesis. Quiero hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del grupo de Análisis Instrumental y al Área de Química Analítica, en particular a Marisol, la mejor técnico de laboratorio del mundo.*

*A mis compañer@s y amig@s: Cristina, Laura H., Edna, Leticia, Laura R. y Borja, estén donde estén se merecen buenas palabras ya que con ellos he compartido laboratorio, horas de trabajo y buenos ratos tanto dentro como fuera de la facultad.*

*Y a tantos otros, como Marta, Mariluz, María, Cristina, Laura A.... que me han acompañado de una manera u otra a lo largo de estos años.*

*A todos ell@s por aguantarme y escucharme, o simplemente estar ahí en lo bueno y en lo malo, mil gracias.*

*Finalmente, aunque no por ello menos importante, mil gracias a mis financiadores: mis padres. Como nos dijeron hace tiempo: “La mejor herencia que os podemos dejar es una buena educación”. Por ello, esta tesis no es solo mi triunfo sino también el suyo que con su esfuerzo me lo han dado todo en esta vida.*

*No puedo olvidarme por supuesto, de mi hermano. Esa persona que he echado de menos desde el primer día que pisé esta Facultad.*







1.1.1.1.	Diseño de experimentos para electrodos añadiendo 200 $\mu\text{L}$ de CNFs.....	91
1.1.1.2.	Diseño de experimentos para electrodos añadiendo 400 $\mu\text{L}$ de CNFs.....	97
1.2.	Pruebas con otros disolventes para CNFs .....	101
1.2.1.	1,2-Dicloroetano (DCE).....	101
1.2.2.	Cloroformo.....	103
1.2.3.	Etanol.....	106
1.2.3.1.	Ferrocenometanol .....	107
1.2.3.1.1.	$I$ vs. $v^{1/2}$ .....	107
1.2.3.1.2.	$I$ vs. $C_{\text{FcMeOH}}$ .....	111
1.2.3.2.	$\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ .....	113
1.3.	Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la dispersión de CNFs .....	115
1.4.	Espectroscopía Raman de CNFs .....	116
2.	Nanotubos de carbono (CNTs).....	118
2.1.	Pruebas con distintos dispersantes.....	118
2.1.1.	Dodecilsulfato sódico (SDS).....	118
2.1.2.	Etanol.....	121
2.1.3.	Cloroformo.....	122
2.1.4.	DCE .....	123
2.1.4.1.	Ferrocenometanol .....	123
2.1.4.2.	Dopamina .....	125
<b>Capítulo II.....</b>		<b>129</b>
1.	Electrodos de bismuto .....	131

2.	Determinación de metales pesados mediante película de bismuto...	
	131	
2.1.	Electrodeposición de bismuto sobre nanofibras de carbono (CNFs).....	132
2.1.1.	Método ex-situ .....	132
2.1.1.1.	Aplicando un potencial constante .....	132
2.1.1.2.	Aplicando un potencial constante, opción B.....	136
2.1.1.3.	Aplicando un barrido de potencial.....	141
2.1.2.	Método in-situ .....	142
2.1.3.	Análisis de redisolución potenciométrico (PSA) .....	145
2.1.4.	Determinación de metales pesados, otras variables a tener en cuenta .....	147
2.1.4.1.	Diseño de experimentos para 0.27 $\mu\text{M}$ de $\text{Cd}^{2+}$ y 0.15 $\mu\text{M}$ de $\text{Pb}^{2+}$ .....	151
2.1.4.2.	Diseño de experimentos para 0.43 $\mu\text{M}$ de $\text{Cd}^{2+}$ y 0.24 $\mu\text{M}$ de $\text{Pb}^{2+}$ .....	156
2.2.	Electrodeposición de bismuto sobre nanofibras de carbono (CNTs).....	161
2.2.1.	Determinación de metales con CNTs en diferentes dispersantes.....	161
2.2.1.1.	SDS como dispersante.....	161
2.2.1.2.	DCE como dispersante.....	162
3.	Nanohilos de bismuto .....	164
4.	Nanopartículas .....	166
4.1.	Nanopartículas de Bismuto.....	167
4.1.1.	Síntesis química de BiNPs.....	167

4.1.1.1.	CNFs/Cloroformo.....	168
4.1.1.2.	CNFs/Etanol.....	173
4.1.1.2.1.	Determinación de cadmio empleando un electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE/PET .....	176
4.1.1.2.1.1.	Optimización de los parámetros de fabricación del electrodo.....	176
4.1.1.2.1.2.	Detección de Cadmio .....	180
4.1.2.	Síntesis electroquímica de BiNPs .....	182
4.1.2.1.	CNFs/Cloroformo.....	182
4.1.2.2.	CNFs/Etanol.....	186
4.1.2.2.1.	Electroquímica .....	186
4.1.2.2.2.	Espectroelectroquímica.....	188
4.2.	Nanopartículas de Oro.....	196
4.2.1.	Síntesis química de AuNPs .....	196
4.2.1.1.	Fabricación de electrodos .....	198
4.2.1.2.	Determinación de dopamina .....	199
5.	Microscopías electrónicas de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).....	202
5.1.	Nanopartículas de bismuto .....	202
5.2.	Nanopartículas de oro .....	203
	<b>Capítulo III .....</b>	<b>209</b>
1.	Vitamina B <sub>12</sub> .....	211
1.1.	Primeras pruebas: CNFs vs CNTs.....	211
1.1.1.	Electrodos de nanofibras de carbono .....	211
1.1.2.	Electrodos de nanotubos de carbono .....	212

1.1.3.	Electrodos de bismuto.....	213
2.	Determinación de vitamina B <sub>12</sub> .....	214
2.1.	Filtros con 0.4 mL de CNFs o CNTs .....	215
2.2.	Filtros con 1 mL de CNFs o CNTs .....	216
3.	Determinación de vitamina B <sub>12</sub> con electrodos de CNFs .....	217
4.	Determinación de vitamina B <sub>12</sub> en muestras complejas .....	220
5.	Medidas espectroelectroquímicas .....	224
6.	Influencia del pH sobre la vitamina B <sub>12</sub> .....	226
6.1.	Análisis para el pico anódico Co(II)/Co(III) .....	228
6.2.	Análisis para el pico anódico Co(I)/Co(II) .....	231
<b>Capítulo IV</b>	.....	<b>237</b>
1.	Determinación de colorantes.....	239
2.	Determinación de amarillo ocaso FCF.....	242
2.1.	Electrodo de carbono comercial.....	242
2.2.	Electrodo de nanofibras de carbono .....	246
3.	Determinación de azorrubina.....	248
3.1.	Electrodo de carbono comercial.....	248
3.2.	Electrodo de nanofibras de carbono .....	252
<b>Conclusiones y perspectivas de futuro</b>	.....	<b>255</b>
<b>Bibliografía</b>	.....	<b>261</b>



## *Índice de abreviaturas*

<b>GCE:</b>	Electrodo de carbono vitrificado
<b>CPE:</b>	Electrodo de pasta de carbono.
<b>BiFE:</b>	Electrodo de film de bismuto
<b>SPE:</b>	Electrodo serigrafiado
<b>CNTs</b>	Nanotubos de carbono
<b>CNFs</b>	Nanofibras de carbono
<b>AuNPs:</b>	Nanopartículas de oro
<b>BiNPs:</b>	Nanopartículas de bismuto
<b>MWCNTs:</b>	Nanotubos de carbono de pared múltiple
<b>SWCNTs:</b>	Nanotubos de carbono de pared simple
<b>GECE:</b>	Electrodo de grafito-epoxi
<b>GN:</b>	Grafeno
<b>PANI:</b>	Polianilina
<b>GO:</b>	Óxido de grafeno
<b>PA:</b>	Ácido fítico
<b>OMC:</b>	Carbono mesoporoso ordenado
<b>MES:</b>	2-mercaptoetanosulfonato
<b>GS:</b>	Nanoláminas de grafeno
<b>Cys:</b>	Cisteína.
<b>SnNPs:</b>	Nanopartículas de estaño
<b>SWASV :</b>	Voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada
<b>DPASV:</b>	Voltamperometría de redisolución anódica diferencial de pulsos
<b>SWAdCSV:</b>	Voltamperometría de redisolución catódica adsortiva de onda cuadrada
<b>GNFs:</b>	Nanofibras de grafito
<b>Bi<sub>sp</sub>SPE:</b>	Electrodo serigrafiado con bismuto pulverizado
<b>MFE:</b>	Electrodo de película de mercurio
<b>DME:</b>	Electrodo de gota de mercurio
<b>HMDE:</b>	Electrodo de gota colgante de

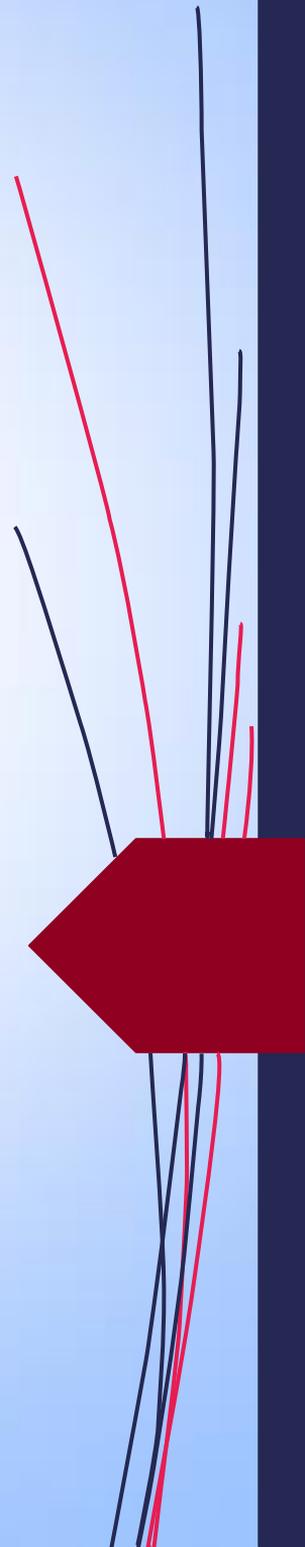
	mercurio
<b>DHP:</b>	Dihexadecil hidrógeno fosfato
<b>Ref<sup>a</sup>:</b>	Referencia
<b>LOD:</b>	Límite de detección
<b>PGE:</b>	Electrodo de grafito pirolítico
<b>BDDE:</b>	Electrodo de diamante dopado con boro
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>CV</b>	Voltamperometría cíclica
<b>FcMeOH o FcMet</b>	Ferrocenometanol
<b>PET</b>	Polietilentereftalato
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>DCE</b>	1,2-dicloroetanol
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>Sy<sub>x</sub></b>	Error estándar
<b>RSD</b>	Desviación estándar residual
<b>BiNWs</b>	Nanohilos de bismuto
<b>HAc</b>	Ácido acético
<b>NaAc</b>	Acetato de sodio
<b>WE</b>	Electrodo de trabajo
<b>RE</b>	Electrodo de referencia
<b>CE</b>	contraelectrodo
<b>CNFs/PTFE/PET</b>	Electrodo de nanofibras de carbono impregnadas sobre un filtro de teflón fijado a una lámina de polietilentereftalato.
<b>BiNPs/CNFs/PTFE/PET</b>	Electrodo de nanopartículas de bismuto y nanofibras de carbono impregnadas sobre un filtro de teflón fijado a una lámina de PET
<b>AuNPs/CNTs/PTFE/PET</b>	Electrodo de nanopartículas de oro y nanotubos de carbono impregnados sobre un filtro de teflón fijado a una lámina de PET
<b>P<sub>period</sub></b>	Período de pulso
<b>P<sub>width</sub></b>	Anchura de pulso
<b>E<sub>pulse</sub></b>	Potencial de pulso
<b>Estep</b>	Incremento de potencial

**Econ**  
**tcon**  
**Edep**  
**tdep**  
**teq**

Potencial de acondicionamiento  
Tiempo de acondicionamiento  
Potencial de deposición  
Tiempo de deposición  
Tiempo de equilibrado



# *Objetivos*





El objetivo de este trabajo es el desarrollo de nuevos dispositivos electrónicos para fines analíticos. Para ello se han desarrollado electrodos con distintos tipos de nanomateriales de carbono, así mismo se ha modificado su superficie electrónica con distintos tipo de nanopartículas.

Las últimas décadas han supuesto una gran revolución y evolución de los materiales empleados en los electrodos. Desde aquellos electrodos de mercurio hasta los últimos materiales basados en estructuras de carbono. El carbono es un material ampliamente utilizado en la electroquímica analítica debido a su gran estabilidad química, inerte químicamente, su buena transferencia cinética electrónica, su amplia ventana de potencial en medio acuoso, su bajo coste y su biocompatibilidad. Hay varias microestructuras disponibles para los materiales de carbono, pasta de carbono, carbón vitrificado, etc. Sin embargo, el descubrimiento en 1991 de los nanotubos de carbono ha provocado un gran progreso nanotecnológico en ciencia de los materiales, y más concretamente en los nanomateriales de carbono, como son los nanotubos de carbono (CNT), las nanofibras de carbono (CNF) y el grafeno.

Estos nuevos nanomateriales han permitido el desarrollo de nuevos dispositivos debido a sus propiedades térmicas, mecánicas, electrónicas y biológicas únicas que no se encuentran en los materiales tradicionales. Además, la modificación de la superficie de estos nanomateriales con nanopartículas, que confieren grandes propiedades, supone una gran ventaja en las técnicas electroanalíticas.

Además, se han optimizado los parámetros influyentes en el proceso de diseño de los electrodos hasta encontrar las condiciones más adecuadas para su posterior utilización analítica.

## Objetivos

---

Una etapa posterior ha sido la búsqueda de aplicaciones analíticas de los electrodos desarrollados en este trabajo, analizando electroquímicamente distintos analitos.

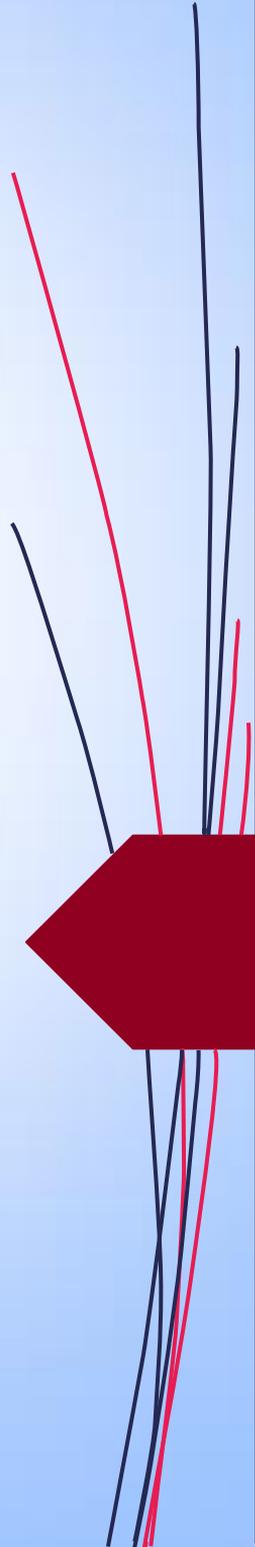
Esta tesis busca también proporcionar un contexto histórico a los nuevos integrantes de la familia de electroquímicos sobre los orígenes de la electroquímica. Desde los primeros pasos con Heyrovský hasta nuestros días, con la revolución de los nanomateriales y las nanopartículas.





*Revisión*

*Bibliográfica*





## 1. Estado del arte

**E**l comienzo de la voltamperometría se debe en gran medida al descubrimiento de la polarografía por Heyrovský. Para entender por qué Heyrovský trabajó con electrodos de mercurio, debemos remontarnos a años antes.

Durante su estancia en Heidelberg, 1873, Gabriel Lippman observó que cuando una gota de mercurio recubierta de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) entra en contacto con un alambre de hierro se contrae, recuperando su forma original al retirar el alambre. Gracias a observaciones como la de John Draper en 1845 que advirtió la depresión de un hilo electrificado de mercurio confinado en un tubo capilar, Lippman pudo desarrollar el electrómetro capilar. Para ello se basó en la teoría de que existía una conexión entre la polarización eléctrica y la tensión superficial, permitiendo explicar los fenómenos observados hasta la fecha [1,2]. Bohumil Kučera determinó la tensión superficial pesando gotas de mercurio que caían de un electrodo de gota de mercurio polarizado [3]. Fue Kučera quien introdujo a Heyrovský en el empleo de los primeros electrodos de mercurio. En su trabajo durante su estancia en la Universidad de Praga, Heyrovský se dedicó a la medición del flujo de corriente así como el tiempo de caída de la gota de mercurio en función del potencial [4]. Los experimentos realizados por Heyrovský en 1922 supusieron el nacimiento de la polarografía, siendo esta un ejemplo de voltamperometría a potencial controlado en la que el electrodo de trabajo es un electrodo de gota de mercurio y el potencial del electrodo de trabajo cambia de modo lineal.

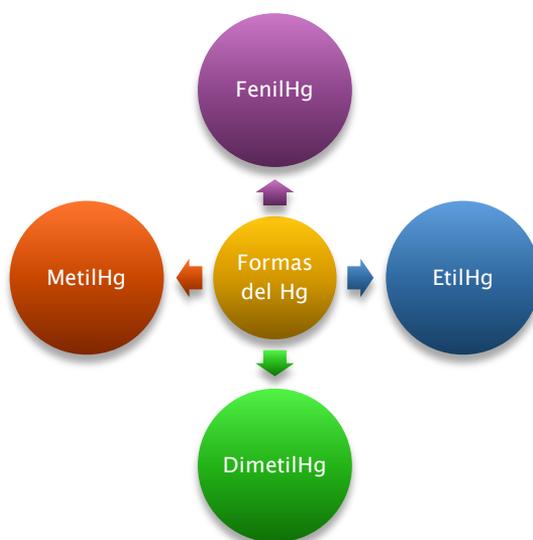
En 1924, Heyrovský y Masuzo Shikata construyeron el primer equipo de polarografía [5,6] y en 1959 Heyrovský fue galardonado con el premio Nobel de química por “*su descubrimiento y desarrollo de los métodos polarográficos de análisis*” [7].

Con todo, no fue hasta 1931 en el que Zbinden aplicara por primera vez la preconcentración electrolítica o pre-electrolisis, característica muy importante de las técnicas de redisolución que permite la determinación de concentraciones muy pequeñas de los analitos. En 1961, Kemula y sus colaboradores describieron por primera vez la preconcentración por adsorción del analito en el electrodo de mercurio [8].

Los electrodos de mercurio engloban los electrodos de película de mercurio (MFE), los de gota colgante de mercurio (HMDE) y los de gota de mercurio (DME). Todos ellos poseen unas características que los hacen altamente deseables. El mercurio a las condiciones de trabajo es líquido, presentando una superficie homogénea y lisa, además de ser un gran conductor eléctrico. Los electrodos de mercurio presentan una amplia ventana de potencial electroquímica, especialmente en dirección catódica, en comparación con otros electrodos [9]. Puede ser utilizado hasta -1.8 V o -2.3 V dependiendo de que el electrolito soporte sea ácido o básico [10]. A estos potenciales exhiben un comportamiento electroquímico bien definido y las curvas intensidad-potencial obtenidas son muy reproducibles debido a la renovación continua de la superficie del electrodo de trabajo. El mayor problema es la posible interferencia provocada por el oxígeno disuelto, por lo que es muy necesario su eliminación burbujando la solución con un gas inerte [11,12].

A finales del siglo XX, numerosos países incorporaron en sus normativas restricciones al uso, exportación y almacenamiento de este metal. En el año 2005 la Unión Europea adoptó una estrategia comunitaria para hacer frente a la problemática suscitada por el destino de miles de toneladas de mercurio procedentes de la industria cloroalcalina [13]. Por ello se marcaron una serie de medidas para intentar reducir las emisiones de mercurio y su exposición al mismo [14]. En 2008 el parlamento Europeo acordó prohibir la exportación de mercurio metálico y el establecimiento de métodos de almacenamiento seguro [15]. Finalmente, en el 2012, la Unión Europea decidió prohibir la comercialización de diversos dispositivos de medición que emplean mercurio [16]. Esta prohibición se basa en la alta toxicidad que presenta el mercurio, tanto para el ser humano como para el medio ambiente.

El mercurio se presenta en diversas formas bien sean en sus compuestos inorgánicos u orgánicos. Los compuestos orgánicos más comunes se recogen en la Figura 1.



**Figura 1. Formas de mercurio.**

Sin embargo, las sales de mercurio orgánicas son incluso más tóxicas que el mercurio elemental, ya que son fácilmente absorbidas por el tracto gastrointestinal [17].

Debido a esta prohibición, los electrodos de materiales sólidos, metales inertes y de carbono se convirtieron en una alternativa para cubrir el lugar que ocupaban los electrodos de mercurio. Entre los materiales inertes se encuentran el oro, el platino, la plata, etc. y entre los materiales de carbono, los de carbono vitrificado, pasta de carbono, grafito, etc. Sin embargo, las características que presentan estos electrodos (repetibilidad y reproducibilidad de la superficie) [18] no eran comparables a las que sí poseía el mercurio. Es por ello, que surgió la necesidad de encontrar un material que poseyera características similares al mercurio a la hora de su aplicación en electroquímica.

## **2. Alternativa: el electrodo de bismuto**

En el año 2000, Wang y su equipo realizaron una gran aportación en la búsqueda de este material [19]. En su artículo propusieron y analizaron el bismuto como posible sustituto de este elemento altamente tóxico.

Los electrodos de bismuto poseen una alta sensibilidad, una respuesta de redisolución bien definida y sin distorsión, amplia ventana de potencial y son fáciles de preparar [19–23]. Muestran insensibilidad al oxígeno disuelto en la disolución y una excelente resolución de los picos vecinos [24], siendo un buen sustituto del mercurio debido a su habilidad de formar aleaciones con varios metales facilitando el proceso de nucleación durante la acumulación de los iones metálicos y a su baja toxicidad.

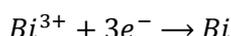
Estas propiedades hacen de este elemento una opción muy atractiva para modificar las superficies de los numerosos electrodos de trabajo que hay disponibles hoy en día. Esta gran variedad se puede encontrar en la extensa bibliografía que existe al respecto. En ella podemos encontrar desde los electrodos más tradicionales, como los electrodos de carbono vitrificado (GCE) y los de pasta de carbono (CPE), hasta los electrodos de metales como el oro, platino, cobre etc. Las recientes investigaciones en el campo de la nanotecnología han permitido incorporar nuevos materiales a los que ya existían, más concretamente, las nanoestructuras de carbono, entre las que se encuentran el grafeno, los fulerenos, los nanotubos de carbono... entre otros. En la Tabla 1 se pueden encontrar numerosos ejemplos de la amplia variedad de electrodos empleados para la deposición de películas de bismuto.

**Tabla 1. Ejemplos bibliográficos para distintos electrodos de trabajo.**

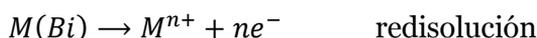
Tipo de electrodo	Ref <sup>a</sup>
Platino	[25,26]
GCE	[21], [27–38]
GECE	[39,40]
Cobre	[26]
Fibras de carbono	[41]
SPE	[42,43]
CNTs	[44–46]
ITO-cinta de carbono	[47]
GO-MWCNTs	[48]
GN	[49,50]
PA-PANI	[51]
Nanopartículas de sílice mesoporoso	[52]
CPE	[53]
PANI-MES/OMC	[54]
GS	[55]
Au-G-cys	[56]
Hilo de Carbono	[57]

Las películas de bismuto no son homogéneas y la nucleación y el crecimiento del bismuto durante la electrodeposición está altamente influenciada por la naturaleza y las condiciones del sustrato empleado [20].

En la bibliografía se describen dos métodos de electrodeposición de bismuto sobre un material conductor. El primer método es conocido como método ex-situ. Este método consiste en la electrodeposición de la película de bismuto empleando una disolución que contenga iones de Bi(III). La reacción que tiene lugar es:



Las condiciones del proceso electrodeposición con una película de bismuto son variables si bien se recomienda condiciones ácidas. La concentración de bismuto en el medio se encuentra entre varias decenas a cientos de mg L<sup>-1</sup>. La formación de la película se lleva a cabo aplicando un potencial catódico entre -0.3 V a -1.2 V durante unos pocos minutos y bajo agitación constante. Después de la formación de la película de bismuto sobre el electrodo, este se introduce en la disolución con la muestra, donde se lleva a cabo la preconcentración y redisolución. Las reacciones que tienen lugar durante la preconcentración de los analitos son:



Donde M<sup>n+</sup> es el ión metálico, y M(Bi) es la aleación del metal y el bismuto.

Sin embargo este método posee una gran desventaja: requiere bastante tiempo debido a que el análisis conlleva dos pasos, formar la película y el análisis de las muestras.

A continuación se muestran una serie de ejemplos que han seguido este procedimiento.

Hutton, et al. [27] modifican su electrodo de carbono vitrificado (GCE) electrodepositando a -1 V durante 5 min bajo constante agitación en una disolución 100 mg L<sup>-1</sup> de Bi(III) en tampón acetato 0.1 M a pH 4.5.

Kreft, et al. [58] emplean este procedimiento para un electrodo de cobre aplicando durante 10 s un potencial de -0.3 V en una disolución 0.2 mM de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en 1 M de HCl.

Asadpour-Zeynali, et al. [59] aplican un potencial de -0.78 V durante 3 min en una disolución 0.15 mg mL<sup>-1</sup> de Bi(III) y 0.05 mg L<sup>-1</sup> de KBr en tapón acetato 0.1 M a pH 4.5.

El segundo método es el método in-situ, y se diferencia muy poco del anterior. La diferencia radica en que en la disolución de bismuto también se encuentran presentes los analitos, metales pesados como plomo, cadmio, cobre, zinc.... Para garantizar la óptima formación de la película la concentración del bismuto ha de encontrarse en un rango entre 400 – 1000 µg L<sup>-1</sup>. Las reacciones que tienen lugar durante la electrodeposición son:



El mayor problema de este método es que los iones de bismuto son muy susceptibles a la hidrólisis en medios neutros y alcalinos. Por lo que el pH ácido de las disoluciones es esencial en este método. Además requieren menor tiempo en el procedimiento experimental [24].

A continuación se expone algún ejemplo en el que se ha empleado este método.

Guo, et al.[31] electrodepositaron la película de bismuto sobre un GCE aplicando un potencial de -1.4 V durante 2 min en una disolución 5  $\mu\text{M}$  de Bi y Zn.

Charalambous y Economou [32] depositaron simultáneamente Bi(III) 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  y los metales (plomo, cadmio e indio) aplicando un potencial de -1.2 V durante 80 s bajo agitación.

Anastasiadou, et al. [37] depositaron la película aplicando un potencial de -1.4 V durante 60 s en una disolución de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Bi en tampón acetato 0.1 M a pH 4.5 en presencia de Zn, Cd, Pb y Cu.

En general, para ambos métodos se emplea una solución de tampón acetato a pH 4.5, con iones de bismuto en el medio, como solución para llevar a cabo la galvanoplastia.

Pauliukaitè, et al. [60] describen tres formas de depositar bismuto sobre un sustrato:

- Aplicando un potencial de manera constante.
- Haciendo barridos cíclicos en dirección catódico.
- Deposición galvanostática, aplicando una intensidad durante un tiempo determinado.

Existe un tercer método para modificar la superficie de los electrodos con bismuto, mediante el empleo un precursor [61]. El precursor de bismuto, por ejemplo  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , modifica la masa del electrodo debido a que al someterle a un potencial en torno a -1 V el óxido de bismuto se reduce a bismuto metálico, de acuerdo a la reacción:



Este método está limitado a su empleo en los electrodos de pasta de carbono [62].

Los analitos analizados mediante electrodos de bismuto son variados, tales como glucosa [25], nitrofenoles [30], vitamina B<sub>12</sub>, colorantes, paracetamol [36], quinina [63], ácido fólico [64], insecticidas [65] y metales pesados: Co, Ni, Cd, Pb, Cu, Cr, Zn, In, U, Tl, Sn y Sb.

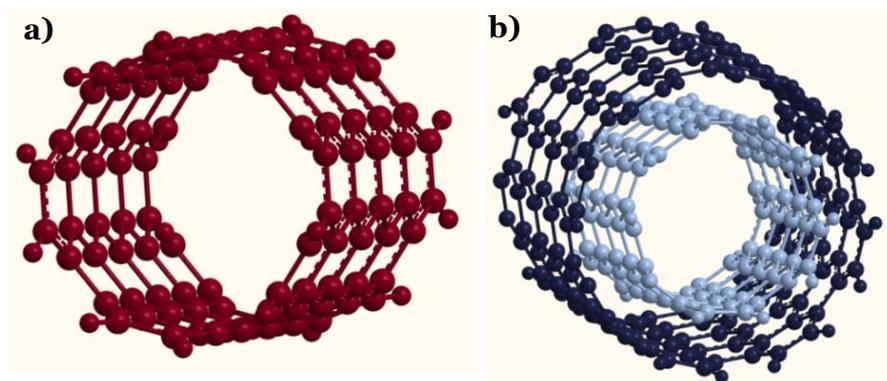
### **3. Nuevos materiales, nuevas posibilidades**

En las últimas décadas, se han incorporado nuevos materiales principalmente de carbono. Estas estructuras poseen unas características que les hacen altamente deseables en los dispositivos electródicos. Entre estos materiales, se pueden encontrar los nanotubos y las nanofibras de carbono.

#### **3.1. Nanotubos de Carbono**

En 1991, S. Iijima publicó su descubrimiento de los nanotubos de carbono [66]. Desde entonces, han sido sujeto de amplios estudios para conocer sus propiedades. Los nanotubos de carbono poseen una alta conductividad eléctrica, gran área superficial, significativa fuerza mecánica y una buena estabilidad química [67,68]. Estas propiedades permiten que su uso en electroquímica aumente la señal voltamperométrica de los analitos, aumente la sensibilidad y la obtención de límites de detección más bajos. Los CNTs están compuestos por átomos de carbono sp<sup>2</sup> dispuestos en hojas de tipo grafito que se enrollan en forma de tubos huecos. Existen dos clases de CNTs: de paredes simples (SWCNTs) y de paredes múltiples

(MWCNTs). Los SWCNTs consisten en tubos huecos simples con diámetros entre 0.4 y 2 nm. Los MWCNTs consisten en tubos huecos concéntricos, y cuyos diámetros oscilan entre los 2 – 100 nm [69].

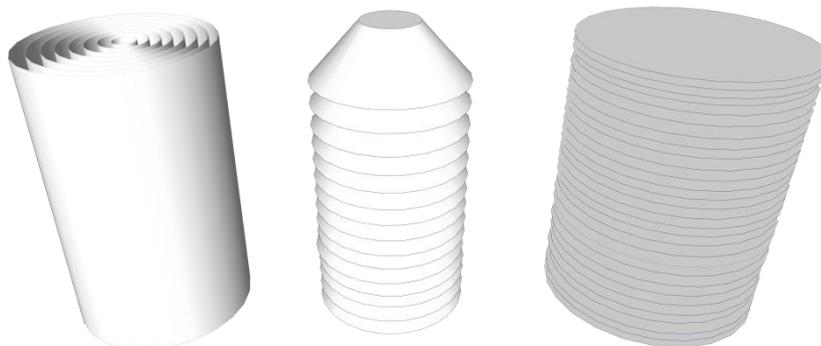


**Figura 2. Estructura de los nanotubos de carbono: a) nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs) y b) nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNTs).**

### 3.2. Nanofibras de Carbono

Las nanofibras de carbono (CNFs) se han considerado como una alternativa de los CNTs debido a su bajo coste y a su fácil síntesis. Las CNFs son filamentos lineales  $sp^2$  y con un diámetro que varía entre los 50 nm y los 300 nm. La estructura de las nanofibras de carbono dependen de las disposiciones de apilamiento pudiéndose ver como capas, troncocónicas o planares, apiladas a lo largo de la longitud del filamento [70]. Esta variabilidad en su estructura proporciona un comportamiento semiconductor [71] debido a la presencia de más defectos. Las CNFs poseen unas excelentes propiedades mecánicas y alta conductividad eléctricas y térmicas [72,73], muy similares a las de los CNTs. La gran ventaja que poseen sobre los CNTs es que poseen una mayor superficie funcionalizada [74]. Por ello, son útiles en diversas aplicaciones

como soporte catalítico [75], biomédicas [76], estructurales [77], baterías ión-Li [78], etc.



**Figura 3. Disposiciones de apilación de las nanofibras de carbono. (izq) En paralelo, (centro) Espiga; (dch) plaquetas apiladas.**

#### **4. Modificación con nanopartículas**

Recientemente, las nanopartículas han adquirido una gran importancia como elementos modificadores de los sensores electroquímicos. Las nanopartículas poseen unas propiedades tanto físicas como químicas que las hacen altamente atractivas, ya que poseen una alta actividad catalítica debido a su pequeño tamaño (1 – 100 nm) y su excelente conductividad [79]. Además, aumentan significativamente la superficie de trabajo del electrodo. Existen nanopartículas de diversos materiales como oro, plata, bismuto, cobre, zinc, titanio, etc.

La síntesis se puede llevar a cabo por dos procedimientos distintos: químicamente o electroquímicamente.

La síntesis química de nanopartículas implica el empleo de un agente reductor, como el borohidruro sódico, el citrato, etc. para llevar a cabo la formación de las nanopartículas.

Granado, et al. [42] sintetizaron químicamente nanopartículas de bismuto. Dispersan 50 mg de bismuto en 30 mL de parafina que posteriormente calientan a 230°C durante 10 h. Las partículas de bismuto obtenidas se lavan con cloroformo y se secan bajo atmósfera de nitrógeno para su almacenamiento.

Desde que Faraday publicara un estudio sobre la preparación y las propiedades del oro coloidal [80], numerosos métodos han sido desarrollados para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs). El método de Turkevich [81] es el más comúnmente usado, en el que el citrato de sodio reduce al ácido tetracloroaúrico.

La síntesis electroquímica implica la formación de las correspondientes nanopartículas sobre la superficie del electrodo de trabajo debido a la aplicación de un potencial.

Tharamani, et al. [82] sintetizan electroquímicamente BiNPs sobre un electrodo de grafito aplicando distintos potenciales. Con ello consiguen diferentes tamaños de partículas así como diversas geometrías.

## **5. Determinación de metales pesados**

Después de siglos de estancamiento en Europa, la Revolución Industrial iniciada en Inglaterra a mediados del siglo XVIII supuso un punto de inflexión en nuestra forma de concebir la industria. Diversas actividades pueden causar la liberalización de elementos tóxicos a sistemas acuáticos y terrestres, contribuyendo a la contaminación del medio ambiente que nos rodea. Los elementos

traza, especialmente los metales pesados, se consideran una de las principales fuentes de contaminación del medio ambiente.

El vertido de estos metales pesados al medio, provoca la transferencia de los mismos a los sistemas vivos, incluyendo las plantas y los animales. Esta concentración de elementos traza en las matrices alimentarias, llega hasta el ser humano a través de las cadenas alimentarias, por lo tanto debe abordarse con gran atención todo lo directamente relacionado con la dieta y la nutrición [83–85]. A pesar de su toxicidad, pequeñas cantidades de algunos de estos elementos traza desempeñan funciones esenciales para la vida.

El cadmio es tóxico a pequeñas concentraciones, pudiendo provocar disfunciones renales. Además puede inducir la desmineralización ósea e interactuar con el hierro, disminuyendo la concentración de hemoglobina y hematocrito, provocando anemia [86,87].

El envenenamiento por plomo puede provocar la inhibición de la síntesis de hemoglobina, disfunciones renal, cardiovascular y del sistema reproductivo. Una exposición crónica afecta al sistema nervioso central y al sistema nervioso periférico. Puede provocar retraso mental y psicosis [88–91].

Metales como el cadmio, el cromo o el níquel son carcinogénicos tanto para humanos como para animales. El cobre, el plomo y el mercurio son probablemente carcinogénicos ya que la exposición a cualquiera de ellos está asociada a diferentes tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, renal, próstata...[92].

Debido a todo esto, se ha hecho necesaria su determinación y caracterización. Entre las técnicas de análisis de metales pesados se

encuentran la espectroscopia de absorción atómica (AAS) [93–97]; espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS) [98–101] y de llama (FAAS) [102–104]; espectrometría de fluorescencia atómica [105,106]; espectrometría de emisión atómica (MP-AES) [107]. Por otro lado se encuentran la espectroscopia de acoplamiento inductivo: ICP-AES/OES [108,109] o ICP-MS [110–112] y espectroscopia por fluorescencia de rayos X (EDXRF)[113]. A pesar de que estas técnicas son sensibles y selectivas, requieren instrumentación sofisticada así como personal especializado y son costosas. Otros métodos de determinación son métodos colorimétricos [114]; fluorimétricos [115,116]; sensores fotoluminiscentes [117] o electroquimioluminiscentes [118]; resonancia de plasmones superficiales (SPR) [119]; sensores basados en ácidos nucleicos (FNAs) [120]; biosensores electroquímicos basados en el ADN [121] y espectroscopia Raman (SERS) [122]. Las técnicas electroquímicas se han erigido con un método alternativo a las anteriormente mencionadas debido principalmente a su sencillez, bajo costo y alta sensibilidad.

A continuación se detallan los trabajos de algunos autores en el campo de la electroquímica.

Chaiyo, et al. [50] utilizan un electrodo serigrafado modificado con un material compuesto de nafión/líquido iónico/grafeno. Este material compuesto se prepara mediante la dispersión de una mezcla de 1 mg de grafeno, 1 mL de dimetilformamida (DMF), 0.5 % (m:v) de líquido iónico y 0.1 % (v:v) de nafión. La modificación del electrodo de trabajo se lleva a cabo mediante drop-casting de 1  $\mu$ L del material compuesto formando una película de bismuto in-situ.

Hui Huang, et al. [51] usan un electrodo de carbón vitrificado modificado con un nanocompuesto de nanofibras de polianilina dopadas con ácido fítico. Además se lleva a cabo la modificación ex-situ del electrodo con bismuto.

Feng, et al. [47] crean un electrodo de trabajo desechable modificado con una película de bismuto. El electrodo de trabajo consta de un ITO (óxido de indio y estaño), sobre el que se pega un trozo de cinta de carbono conductor. En un segundo paso se delimita la superficie con un plástico aislante y a continuación se electrodeposita el bismuto, integrando finalmente los electrodos de referencia y contraelectrodo.

Kokkinos, Economou, et al. [123] emplean el tradicional electrodo de film de bismuto (BiFE). En este caso, la novedad radica en que la deposición del film de bismuto se lleva a cabo por pulverización y delimitando la geometría mediante fotolitografía a un diámetro de 5 mm.

Afkhami, et al. [124] modifican un electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono (MWCNTs) y una base de Schiff. Esto se debe a que la base de Schiff mejora la selectividad y sensibilidad en la determinación de estos metales debido a la interacción de los cationes metálicos con los ligandos de la base.

Lian Zhu, et al. [56] presentan un GCE modificado con un material compuesto de grafeno, nanopartículas de oro (AuNPs) y cisteína. La película de bismuto se lleva a cabo in-situ.

Yang, et al. [52] utilizan el electrodo de carbono vitrificado recubierto con nanopartículas de sílice mesoporoso y posteriormente con bismuto (NanoSiO<sub>2</sub>/BiFE).

Lee, Chen, Li y Liu [125] presentan un GN-Sn/GCS. El electrodo consiste en una hoja de carbono vitrificado (GCS), óxido de grafeno decorado con nanopartículas de estaño (SnNPs).

Zhao, et al. proponen [126] en un electrodo GC modificado con un material compuesto de bismuto, nanotubos de carbono, emeraldina-polianilina y nafi3n. La superficie del electrodo se modifica por drop-casting y posteriormente se realiza la electrodeposición in-situ del bismuto.

Ping, et al. [127] desarrollan un electrodo desechable de película de bismuto modificado electroquímicamente con óxido de grafeno reducido.

Granado, Olivares-Marín y Pinilla [42] presentan la modificación de un electrodo serigrafiado por la adsorción de nanopartículas de bismuto sintetizadas químicamente.

Armstrong, et al. [128] emplean un electrodo de bismuto (BiBE) como alternativa para el análisis de redisolución (SWASV) de Pb (II), Cd (II) y Zn (II).

Li, Jia y Wang [129] llevan a cabo la determinación simultánea de plomo y cadmio mediante un GCE impregnado con una mezcla nanofibras de grafito (GNFs) y nafi3n. El bismuto se deposita sobre la superficie de trabajo in-situ.

Kokkinos y Economou [130] emplean un BiFE para la detección de plomo y cadmio. La película de bismuto se deposita por pulverización sobre un substrato de silicio y la geometría final se define por fotolitografía. Finalmente se impregna con una película de nafi3n.

Prabakar, Sakthivel y Narayanan [131] preparan un electrodo de nanotubos de carbono (MWCNTs) en el que se inmoviliza mercurio.

Sosa, et al. [132] emplean por primera vez un electrodo serigrafiado con bismuto pulverizado ( $\text{Bi}_{\text{sp}}\text{SPE}$ ).

Zou Li, et al. [133] llevan a cabo la determinación de los metales con un electrodo de película de bismuto modificado con óxido de grafeno. El GCE se modifica con  $10\mu\text{L}$  del material compuesto de óxido de grafeno y tionina (TH), electroreduciendo el GO barriendo entre  $-1.3\text{ V}$  y  $1.1\text{ V}$ . Aplicando  $1.1\text{ V}$  el 2-mercaptoetanosulfonato (MES) interacciona con el material compuesto y con nafi3n se recubre finalmente la superficie.

B. dos Santos, et al. [134] determinan cadmio y plomo en un sistema de flujo empleando un electrodo serigrafiado modificado con una película de bismuto ex-situ.

Sandra Cerovac, et al. [135] utilizan un electrodo de carbono vitrificado modificado. Esta consiste en el recubrimiento del electrodo con un material compuesto de nanotubos de carbono (MWCNTs) y partículas de oxiclورو de bismuto sintetizadas químicamente.

Ayenimo y Adeloju [136] describen la detección de varios metales pesados; basados en la inhibición en la respuesta de un biosensor potenciométrico. El biosensor consta de un polipirrol y una enzima, la glucosa oxidasa, sobre un disco de platino.

Pérez-Ràfols, et al. [137] nos enseñan un novedoso electrodo de carbono vitrificado en el que se ha inmovilizado D-penicilamina. En la superficie del GCE se genera in-situ una monocapa de aril

diazonio sobre la que se inmoviliza covalentemente la d-penicilamina.

También determinan estos analitos [138] a través de un electrodo serigrafiado de nanofibras de carbono en el que se ha inmovilizado glutatión. La modificación consta de dos etapas, primero se electroinjeta aril diazonio y posteriormente se inmoviliza covalentemente el glutatión.

Juvêncio, et al. [139] utilizan papel pirolizado como sustrato para la determinación voltamperométrica de metales traza. Se toman 0.7 x 0.7 cm de este papel pirolizado y lo colocan en la parte inferior de la celda gracias a una junta tórica, que delimita el área de trabajo. La superficie de trabajo se modifica in-situ con una película de bismuto.

Wang, Li y Liu [140] emplean películas de grafeno como electrodos de trabajo, que son modificados con una capa porosa de polianilina junto con nanopartículas de bismuto depositadas in-situ.

Tang, et al. [54] presentan la modificación de un electrodo de carbono vitrificado (GCE) con carbono mesoporoso ordenado (OMC), MES-atado a polianilina (PANI) y bismuto.

J. Wang, et al. [55] utilizan láminas de grafeno (GS) para modificar un electrodo de carbono vitrificado. Posteriormente se modifica con bismuto.

Die Yang, et al. [38] llevan a cabo la determinación de trazas de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  empleando un electrodo de carbono vitrificado, recubierto con una gota de la mezcla de nafión y un líquido iónico para posteriormente electrodepositar in-situ bismuto.

Koirala, et al. [141] construyen un electrodo de pasta de carbono modificado con una semicarbazona.

Anastasiadou, et al. [37] modifican in-situ un electrodo de carbono vitrificado con una película de bismuto.

Ayman Ali Saeed, et al. [57] elaboran un micro-electrodo de hilos de carbono modificado in-situ con una película de bismuto.

Dimovasilis y Prodromidis [142] preparan tres tipos de microesferas de bismuto gracias a tres procesos sol-gel diferentes. Estos materiales se emplean como tintas para la fabricación del electrodo serigrafiado.

Pikna, Heželová y Kováčová [143] determinan simultáneamente Cd, Pb, Cu y Hg. con un electrodo de grafito impregnado de parafina (PIGE). La modificación del PIGE se lleva a cabo usando MWCNTs suspendidos en  $\text{HNO}_3$ .

Mettakoonpitak, et al. [144] utilizan un electrodo de carbono serigrafiado (CSPEs) para determinar selectivamente Zn, Cd y Pb. El CSPEs se modifica con nanopartículas de plata (AgNPs) por electroespray y con una película de bismuto.

Wonsawat, et al. [145] emplean un CPE modificado con una película de bismuto acoplado a una celda de flujo para la determinación de plomo y cadmio.

Mediana-Sánchez, et al. [146] fabrican un electrodo de película de grafito de papel desechable.

Pengfei Niu, et al. [53] realizaron voltamperometría de redisolución anódica (SWASV) y voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (SWAdCSV) con un electrodo de pasta de carbono y bismuto. Para preparar el electrodo se añadió  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a una mezcla de glicerol, ácido acético, resorcinol y formaldehído, pirolizando hasta obtener un nanomaterial compuesto de Bi-C.

Kokkinos, Economou y Raptis [147] determinaron Cd, Pb y Ni mediante SWASV y SWAdCSV con una celda desechable de tres electrodos. El dispositivo consta de un electrodo de trabajo formado por un conjunto de microdiscos de bismuto, plata como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo.

Dimovasilis y Prodromidis [148] utilizan por primera vez la síntesis de bismuto modificado con (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (MPTMS) para la determinación de plomo y cadmio mediante SWASV. El MPTMS se emplea para la formación de un xerogel modificado con bismuto, posteriormente este xerogel se emplea para modificar un electrodo de carbono vitrificado (GCE).

Huang, et al. [48] preparan un novedoso electrodo de GCE modificado con un nanomaterial compuesto híbrido de nanotubos de carbono (MWCNTs) y láminas de óxido de grafeno (GO).

Sosa, Barceló, Serrano, et al. [149] emplean un electrodo serigrafiado (SPE) modificado in-situ con antimonio para la determinación simultánea de cobre, cadmio y plomo mediante DPASV.

Nipapan Ruecha, et al. [49] fabrican un electrodo serigrafiado modificado con un nanomaterial compuesto de polianilina y grafeno (GN/PANI) para la detección de Zn (II), Cd (II) y Pb (II). El electrodo se modifica bien por drop-casting o por electrospray.

Hao, et al. [150] utilizan un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanopartículas de óxido de bismuto (BiONPs) y quitosan (CS).

Jedryczko, Pohl y Welna [151] emplean un electrodo GC recubierto por una película de mercurio que a su vez está protegida por nafión.

El dispositivo se incorpora a un sistema de flujo para determinar Cd, Cu, Pb y Zn.

En la Tabla 2 se resumen los trabajos anteriormente descritos en función del electrodo de trabajo empleado y los analitos determinados.

**Tabla 2. Resumen de las diferentes electrodos empleados para la determinación de metales pesados.**

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref <sup>a</sup>
N/IL/GN/SP E	Cd	0.1 – 100 ng mL <sup>-1</sup>	0.06 ng mL <sup>-1</sup>	[50]
	Pb		0.08 ng mL <sup>-1</sup>	
Nafión/PA- PANI/GCE	Cd	0.05 – 60 µg L <sup>-1</sup>	0.02 µg L <sup>-1</sup>	[51]
	Pb		0.05 µg L <sup>-1</sup>	
Carbon tape- BiFE	Pb	10 – 500 µg L <sup>-1</sup>	2 µg L <sup>-1</sup>	[47]
	Pb	5 – 45 µg L <sup>-1</sup>	0.5 µg L <sup>-1</sup>	[123]
	Cd	10 – 90 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	
Z- BHPBP/MW CNT/CPE <sub>IL</sub>	Pb	1 – 1100 ng mL <sup>-1</sup>	0.25 ng mL <sup>-1</sup>	[124]
	Cd	0.4 – 1200 ng mL <sup>-1</sup>	0.74 ng mL <sup>-1</sup>	
Au-GN- cys/GCE	Pb	0.5 – 40 µg L <sup>-1</sup>	0.05 µg L <sup>-1</sup>	[56]
	Cd		0.10 µg L <sup>-1</sup>	
NanoSiO <sub>2</sub> /Bi FE	Pb	2 – 150 µg L <sup>-1</sup>	0.2 µg L <sup>-1</sup>	[52]
	Cd		0.6 µg L <sup>-1</sup>	
GN-Sn/GSC	Pb	10 – 100 nM	0.63 nM	[125]
	Cd		0.60 nM	
	Cu		0.52 nM	
MWCNT- EBP-NA/GCE	Pb	10 – 50 µg L <sup>-1</sup>	0.08 µg L <sup>-1</sup>	[126]
	Cd		0.06 µg L <sup>-1</sup>	
SPE/ERGN O/BiF	Pb	1 – 60 µg L <sup>-1</sup>	0.8 µg L <sup>-1</sup>	[127]
	Cd		0.5 µg L <sup>-1</sup>	

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref <sup>a</sup>
BiNPs-SPCE	Zn		2.6 ng mL <sup>-1</sup>	
	Cd		1.3 ng mL <sup>-1</sup>	[42]
	Pb		0.9 ng mL <sup>-1</sup>	
BiBE	Pb		93 ng mL <sup>-1</sup>	
	Cd	10 – 100 µg L <sup>-1</sup>	54 ng mL <sup>-1</sup>	[128]
	Zn		396 ng mL <sup>-1</sup>	
BiF/GNFs- Na/GCE	Cd	0.2 - 50 µg L <sup>-1</sup>	0.09 µg L <sup>-1</sup>	[129]
	Pb		0.02 µg L <sup>-1</sup>	
Nafión- micro BiFE	Pb	0 -45 µg L <sup>-1</sup>	0.5 µg L <sup>-1</sup>	[130]
	Cd	0 -90 µg L <sup>-1</sup>		
Hg(II)/MW CNT	Pb	0.2 – 50 µg L <sup>-1</sup>	0.94 ng mL <sup>-1</sup>	[131]
	Cd		1.8 ng mL <sup>-1</sup>	
Bi <sub>sp</sub> SPE	Pb	0.53 – 19.8 µg L <sup>-1</sup>	0.16 µg L <sup>-1</sup>	[132]
	Cd	0.33 – 12.3 µg L <sup>-1</sup>	0.10 µg L <sup>-1</sup>	
ERGO-TH- MES/GCE	Cd	1 – 40 µg L <sup>-1</sup>	0.1 µg L <sup>-1</sup>	[133]
	Pb		0.05 µg L <sup>-1</sup>	
SPE-BiFE	Cd	6.30 – 75.6 µg L <sup>-1</sup>	0.6 µg L <sup>-1</sup>	[134]
	Pb	3.20 – 38.4 µg L <sup>-1</sup>	0.1 µg L <sup>-1</sup>	
BiOCl/MWC NT-GCE	Pb	5 - 50 µg L <sup>-1</sup>	1.9 µg L <sup>-1</sup>	[135]
	Cd		4.0 µg L <sup>-1</sup>	
Ppy-Gox	Cu	0.079 -16 µM	0.079 µM	[136]
	Hg	0.025 – 5 µM	0.025 µM	
	Pb	0.10 – 15 µM	0.024 µM	
	Cd	0.04 – 62 µM	0.044 µM	
Penicilamin a-GCE	Pb	10.07 – 115.14 µg L <sup>-1</sup>	3.02 µg L <sup>-1</sup>	[137]
	Cd	14.34 – 115.23 µg L <sup>-1</sup>	4.30 µg L <sup>-1</sup>	
GSH- SPCNFE	Pb	10.1 – 150.1 µg L <sup>-1</sup>	3.0 µg L <sup>-1</sup>	[138]
	Cd	10.8 – 150.1 µg L <sup>-1</sup>	3.2 µg L <sup>-1</sup>	

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref <sup>a</sup>
Bi-Papel-pirolizado	Pb	5 – 300 µg L <sup>-1</sup>	0.39 ppb	[139]
	Cd	5-300 µg L <sup>-1</sup>	0.25 ppb	
	Zn	10 -200 µg L <sup>-1</sup>	0.26 ppb	
Bi/PANI/GN	Pb	0.33 nM – 1.1 µM	0.33 nM	[140]
PANI-MES/OMC/GCE	Cd	1 – 120 nM	0.26 nM	[54]
	Pb		0.16 nM	
GS/GCE	Pb	0.1 – 100 µg L <sup>-1</sup>	0.045 µg L <sup>-1</sup>	[55]
	Cd	0.5 – 100 µg L <sup>-1</sup>	0.35 µg L <sup>-1</sup>	
NC/IL-BiFE	Pb	10 – 120 µg L <sup>-1</sup>	0.2 µg L <sup>-1</sup>	[38]
	Cd		0.5 µg L <sup>-1</sup>	
Carbazona-CPE	Pb	0.25 – 12.5 mg L <sup>-1</sup>	78.81 µg L <sup>-1</sup>	[141]
	Cd	0.25 – 12.5 mg L <sup>-1</sup>	96.17 µg L <sup>-1</sup>	
	Zn	0.25 – 10 mg L <sup>-1</sup>	91.88 µg L <sup>-1</sup>	
BiFE-GCE	Pb	10 – 100 µg L <sup>-1</sup>	0.40 µg L <sup>-1</sup>	[37]
	Cd	5 – 50 µg L <sup>-1</sup>	0.10 µg L <sup>-1</sup>	
	Zn	20 – 280 µg L <sup>-1</sup>	2.80 µg L <sup>-1</sup>	
	Cu	10 – 80 µg L <sup>-1</sup>	0.20 µg L <sup>-1</sup>	
Bi/IPA-treated carbon thread electrode	Cd	5 – 110 µg L <sup>-1</sup>	1.08 µg L <sup>-1</sup>	[57]
	Pb		0.87 µg L <sup>-1</sup>	
Bi-SG(2)	Pb	2 – 32 µg L <sup>-1</sup>	1.2 mg L <sup>-1</sup>	[142]
	Cd	3 – 14 µg L <sup>-1</sup>	1.4 mg L <sup>-1</sup>	
AgNPs/Bi/Naf ión/CSPEs	Zn	5.0 – 400 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	[144]
	Cd	5.0 – 400 µg L <sup>-1</sup>	0.5 µg L <sup>-1</sup>	
	Pb	0.1 – 500 µg L <sup>-1</sup>	0.1 µg L <sup>-1</sup>	
PIGE/MWCN Ts/HNO <sub>3</sub>	Cd	1.96 – 5.66 µM	0.298 µM	[143]
	Pb		0.483 µM	
	Cu		0.381 µM	
	Hg		0.679 µM	
BiFE-CPE	Cd	0.5 – 100 µg L <sup>-1</sup>	0.08 µg L <sup>-1</sup>	[145]
	Pb	0.25 – 250 µg L <sup>-1</sup>	0.07 µg L <sup>-1</sup>	

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref <sup>a</sup>
Lab-on-paper	Pb	10 -100 ppb	7 ppb	[146]
	Cd		11 ppb	
Bi-CPE	Cd	1 – 100 ppb	0.81 ppb	[53]
	Pb	1 – 100 ppb	0.65 ppb	
	Ni	10 – 150 ppb	5.47 ppb	
Microelectrode array	Cd	2.5 – 15 µg L <sup>-1</sup>	0.7 µg L <sup>-1</sup>	[147]
	Pb		0.6 µg L <sup>-1</sup>	
	Ni		0.7 µg L <sup>-1</sup>	
GCE/Bi-xerogel/Nafión	Pb	5 10 <sup>-9</sup> – 1 10 <sup>-7</sup> M	1.3 µg L <sup>-1</sup>	[148]
	Cd		0.37 µg L <sup>-1</sup>	
GO/MWCNTs /nafión/GCE	Pb	0.5 – 30 µg L <sup>-1</sup>	0.2 µg L <sup>-1</sup>	[48]
	Cd		0.1 µg L <sup>-1</sup>	
	Cd		11.5 – 72.4 µg L <sup>-1</sup>	
SbSPCE	Pb	16.8 – 62.6 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	[149]
	Cu	5.3 – 99.8 µg L <sup>-1</sup>	1.6 µg L <sup>-1</sup>	
GN/PANI	Cd	1 – 300 µg L <sup>-1</sup>	0.1 µg L <sup>-1</sup>	[49]
	Pb			
BiONPs-CS-GCE	Cd	0.8 – 5.6 µM	0.05 µM	[150]
	Pb	0.4 – 2.8 µM	0.15 µM	
NHgFEs	Cd	1 – 15 µg L <sup>-1</sup>		[151]
	Cu	10 – 150 µg L <sup>-1</sup>		
	Pb	2.5 – 15 µg L <sup>-1</sup>		
	Zn	25 – 250 µg L <sup>-1</sup>		

## 6. Determinación de vitaminas

Las vitaminas constituyen un grupo de compuestos que facilitan el metabolismo y el aprovechamiento de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, así como el mantenimiento de diversos procesos

fisiológicos [152]. Se encuentran en cantidades muy pequeñas en los alimentos y no pueden ser sintetizados en el organismo, debiendo, por tanto, ser aportados por la dieta [153].

En la Tabla 3 se puede ver el IDR (ingestión diaria recomendada) e IDS (ingestión diaria sugerida) de las vitaminas y otros oligoelementos.

**Tabla 3. Recomendaciones de consumo de vitaminas y de algunos elementos químicos [152].**

	IDR	IDS
<b>Proteína (g/kg de peso corporal)</b>	1	
<b>Fibra dietética (g)</b>	30	
<b>Vitamina A (µg)</b>		568
<b>Vitamina B<sub>1</sub> (µg)</b>		800
<b>Vitamina B<sub>2</sub>( µg)</b>		840
<b>Vitamina B<sub>6</sub> (µg)</b>		930
<b>Niacina (mg)</b>		11
<b>Ácido fólico( µg)</b>		380
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>		2.1
<b>Vitamina C (mg)</b>	60	
<b>Vitamina D (µg)</b>		5.6
<b>Vitamina E (mg)</b>		11
<b>Vitamina K( µg)</b>		78
<b>Ácido pantoténico (mg)</b>		4.0
<b>Calcio (mg)</b>		900
<b>Cobre (µg)</b>		650
<b>Cromo (µg)</b>		22
<b>Flúor (mg)</b>		2.2
<b>Fósforo (mg)</b>	664	
<b>Hierro (mg)</b>		17
<b>Magnesio (mg)</b>		248
<b>Selenio (µg)</b>		41
<b>Yodo (µg)</b>		99
<b>Zinc (mg)</b>		10

Forman un conjunto de 13 compuestos con estructuras químicas diversas, debido a esto no se han podido clasificar con base en su estructura, sino más bien por su solubilidad en liposolubles e hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) son aquellas solubles en disolventes orgánicos y en aceites, pero insolubles en agua. Las vitaminas hidrosolubles son solubles en agua y están constituidas por el complejo B, que incluye tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, biotina, folatos, niacina y ácido pantoténico, así como por la vitamina C [152].

Los requerimientos diarios de vitaminas varían entre ambos sexos y también por la edad, embarazos y lactancia [152].

### **6.1. Vitamina B<sub>12</sub>**

La historia del descubrimiento de la vitamina B<sub>12</sub> está marcada por una serie de importantes contribuciones de diversas áreas incluyendo la nutrición humana y animal, la medicina, la química, la microbiología, la cristalografía de rayos X y la farmacia.

La deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> o anemia perniciosa, se identificó en la década de 1820, siendo Combe el primero en describirla como debida a «algún trastorno de los órganos digestivos o de asimilación». No fue hasta 1925, que Whipple y Robscheit-Robbins observaron que el hígado crudo tenía efectos curativos, haciéndose evidente el protocolo de tratamiento de la enfermedad. Gracias a este descubrimiento, en 1926, Minot y Murphy demostraron que la enfermedad se podía curar ingiriendo grandes cantidades de hígado, lo que les valió el premio Nobel.

En 1948, Folkers, Sharp y Dohme de Merck (EEUU) y Smith y Parker, de Glaxo (Gran Bretaña) purificaron simultáneamente la vitamina B<sub>12</sub> a partir de hígado.

En 1949 se aisló la estructura cristalina y se identificaron la cianocobalamina y la hidroxocobalamina, estableciéndose posteriormente, la estructura de la vitamina B<sub>12</sub>. En 1964, Hodgkin fue galardonado con el premio Nobel por su trabajo con cristalografía de rayos X en el descubrimiento de su estructura química.

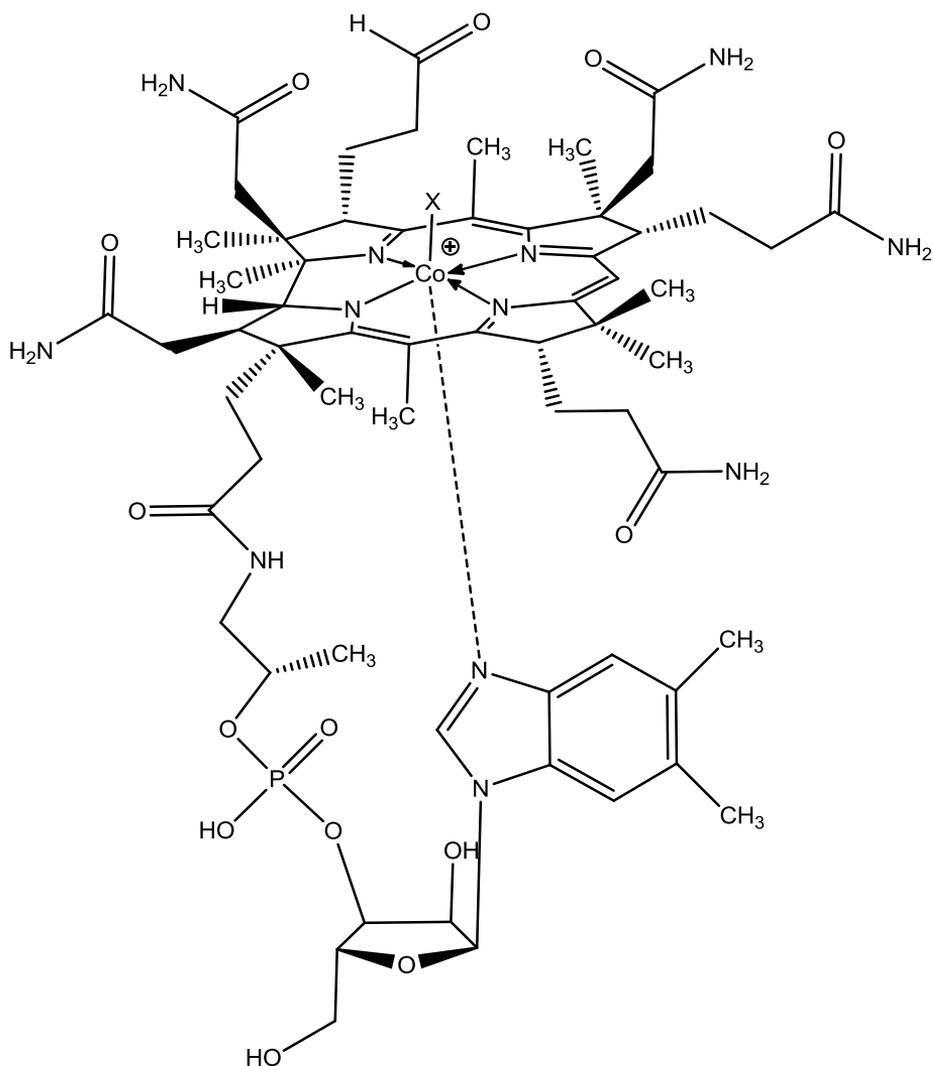
El conocimiento de la función bioquímica de la vitamina se estableció en 1959, año en que quedó establecida su función como coenzima (adenosilcobalamina) de la metilmalonil-CoA mutasa, y en 1963 como cofactor (metilcobalamina) de la metionina sintasa [154–156].

### 6.2. Descripción físico-química

Las cobalaminas pertenecen a un grupo con una estructura muy compleja, en la Figura 4 se puede ver su estructura. La estructura de la vitamina B<sub>12</sub> consiste en un átomo central de cobalto coordinado a (i) 4 átomos de nitrógeno del anillo corrina, (ii) a un nucleótido 5,6-dimetilbencimidazol (Bzm), que a su vez está ligado a un átomo de carbono del anillo corrina y (iii) a un grupo ciano. El átomo N7 del grupo bencimidazol puede actuar como un ligando axial del átomo de cobalto en la posición  $\alpha$ . El grupo ciano actúa como ligando axial en la posición  $\beta$ , completando la geometría octaédrica del átomo central. La posición  $\beta$  puede estar ocupada por diversos ligandos, dando origen a diferentes formas de la cobalamina [58], [155]–[157]:

- Un ión ciano CN<sup>-</sup> (cianocobalamina).
- Un grupo hidroxilo OH<sup>-</sup> (hidroxocobalamina).
- Un grupo metilo -CH<sub>3</sub> (metilcobalamina).

- Un resto 5'desoxiadenosilo (desoxiadenosilcobalamina o coenzima B<sub>12</sub>).



**Figura 4. Estructura química de la cobalamina.**

La cianocobalamina es poco estable en medios ácidos, alcalinos, y en presencia de agentes reductores. Su aspecto es de polvo cristalino de color rojo, soluble en alcohol y en agua. Sensible a la luz y a los rayos ultravioletas [154], [158].

### **6.3. Función en el cuerpo humano y deficiencia**

Esta vitamina participa en varios procesos biológicos, incluyendo la formación de proteínas [159], la síntesis de ADN y actúa como coenzima en diversas reacciones de isomerización, deshidrogenación y metilación [152]. Participa en la activación del ácido fólico e interviene en la utilización de ácidos grasos, en la formación de eritrocitos y en la síntesis de metionina a partir de homocisteína [152]. Su función primaria es mantener en niveles normales la hematopoyesis, ya que su deficiencia conduce a la anemia megaloblástica. Su carencia puede provocar la desmielinización del sistema nervioso central [155] conduciendo a una disminución de la sensibilidad en las extremidades inferiores, pérdidas de memoria, Alzheimer [160], etc. entre otros síntomas [161].

Entre las principales causas de deficiencia, destacan las que se describen a continuación: Ingesta disminuida, alteraciones gástricas, alteraciones intestinales, errores congénitos o interacciones con fármacos y alcohol [154], [162,163].

### **6.4. Ingesta**

Nutricionalmente la vitamina B<sub>12</sub> incluye todas las cobalaminas biológicamente activas (cianocobalamina, hidroxocobalamina, acuocobalamina, nitrocobalamina, deoxiadenosilcobalamina, metilcobalamina y sulfitocobalamina) en el cuerpo humano [158].

La vitamina B<sub>12</sub> no se encuentra presente en alimentos vegetales y sólo se encuentra en alimentos tales como la leche, el huevo y productos de origen animal [152].

**Tabla 4. Contenido vitamínico de algunos alimentos [152].**

Alimento	Biotina ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	Ácido pantoténico ( $\text{mg}/100\text{g}$ )	Vitamina B <sub>6</sub> ( $\text{mg}/100\text{g}$ )	Vitamina B <sub>12</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
<b>Carne de res</b>	2.6-3.4	0.25-0.35	0.08-0.3	2.0-3.0
<b>Carne de cerdo</b>	4.0-6.0	0.4-0.6	0.08-0.3	0.6-0.9
<b>Carne de pollo</b>	9.0-11.0	0.7-0.9	0.08-0.3	0.2-0.4
<b>Pescado</b>	0.1-3.0	0.2-1.0	0.4-0.5	5.0-14.0
<b>Leche</b>	2.0-5.0	0.3-0.5	0.03-0.3	0.3-0.6
<b>Queso</b>	1.6-1.8	0.15-0.25	0.04-0.8	0.2-2.0
<b>Huevo (unidad)</b>	11.0-13.0	1.0-1.2	0.25	0.4-0.5
<b>Harina de trigo:</b>	7.0-12.0	0.5-0.6	0.4-0.7	
	1.4-3.0	0.2-0.3	0.1-0.3	
<b>Arroz</b>	4.0-6.0			
<b>Manzana</b>	0.9-1.0			
<b>Zumo de naranja</b>	0.5-1.5	0.15-0.17	0.05-0.06	

## 6.5. Determinación

La farmacopea británica recomienda la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> mediante espectrofotometría de UV-Vis. Sin embargo se han propuesto otros muchos métodos [164] como ensayos microbiológicos [165]; inmunológicos [166–168] y de radioisótopos [169]; quimioluminiscencia [170,171]; espectroscopia [172,173]; electroforesis capilar [174]; espectrometría de absorción atómica (AAS) [175]; cromatografía [176,177]; cromatografía líquida (HPLC) [178–188]; fluorescencia [189–191] y espectroscopia Raman (SERS) [192]. Estas técnicas son costosas, requieren mucho tiempo, instrumental sofisticado y personal cualificado, con baja

reproducibilidad y sensibilidad. Por ello, se necesitan desarrollar métodos más rápidos, baratos, simples y eficientes para el análisis de la vitamina B<sub>12</sub>. Esto se resuelve mediante las técnicas electroquímicas.

Mediante la técnica de polarografía [193] se analiza el comportamiento de varias cobalaminas dando como resultado la evidencia de que la naturaleza del ligado en la posición  $\alpha$  o  $\beta$  influye en la reactividad del átomo de cobalto.

El empleo de técnicas voltamperométricas con un electrodo de gota de mercurio [194], permite investigar la vitamina B<sub>12</sub> y sus derivados. La utilización de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) y cloruro de potasio como electrolito soporte elimina la aparición de picos atribuidos a la adsorción de la vitamina. Posteriormente se lleva a cabo el estudio de los derivados de la vitamina B<sub>12</sub>, modificando el ligando axial.

Lexa, et al. [195] estudian el mecanismo redox del sistema B<sub>12r</sub> – B<sub>12s</sub>, empleando la voltamperometría cíclica. Además de investigar la influencia del pH en el proceso redox. Posteriormente, lleva a cabo el estudio de la reducción electroquímica de derivados de la vitamina B<sub>12</sub> [196]. Para ello emplea un electrodo de mercurio y un catión tetrabutilamonio para reducir la adsorción del analito.

Mediante el procedimiento descrito en anteriores artículos, Lexa estudia [197] la diacuocobinamida, para la obtención de más información que permita entender las propiedades de las cobalaminas.

El estudio electroquímico [198] de la vitamina B<sub>12</sub> se lleva a cabo empleando un electrodo de carbono vitrificado (GCE). Las

adiciones sucesivas de cianuro al medio permite ilustrar como este ligando influye en el comportamiento redox de la  $B_{12}$ .

El estudio [199] voltamperométrico de la vitamina  $B_{12}$  en DMSO muestra la importancia de la reacción base-on/base-off en el mecanismo de reducción. El análisis cuantitativo de las alturas de pico y la velocidad de barrido permite la caracterización termodinámica y cinética de esta reacción. Para ello se emplea un electrodo de gota de mercurio. En un estudio posterior [200], observan los efectos cinéticos y termodinámicos en la oxidoreducción del par  $B_{12r}$ - $B_{12s}$ . Por observaciones previas, se ha mostrado la existencia de una relación cualitativa entre la velocidad de transferencia del electrón y la fuerza del enlace entre el átomo de cobalto y el ligando axial. Cuanto más fuerte es el enlace más lenta es la transferencia del electrón. En este último estudio [201], investigan las características termodinámicas y cinéticas del para  $Co(III)/Co(II)$  en función del disolvente y de seis ligandos axiales diferentes. En este caso se emplea un electrodo de carbono vitrificado en lugar de gota de mercurio [157].

El empleo [202] de un electrodo de carbono vitrificado permite el estudio de la cianocobalamina en medio ácido mediante voltamperometría cíclica y polarografía diferencial de impulsos. Se sugiere el mecanismo implicado en las reacciones electroquímicas de la cianocobalamina en función del pH del medio.

Zagal et al. [203] emplean un electrodo de grafito pirolítico en el que se adsorbe irreversiblemente vitamina  $B_{12}$ . El estudio voltamperométrico muestra picos correspondientes a los pares  $Co(II)/Co(I)$  y  $Co(III)/Co(II)$ . Este electrodo “modificado” con la vitamina muestra una substancial actividad catalítica en la reducción del oxígeno.

La investigación [204] bajo condiciones electroquímicas de los reordenamientos de los esqueletos de carbono mediada por derivados hidrófobos de la vitamina B<sub>12</sub>. El átomo de cobalto de la cianocobalamina actúa como centro catalítico en varias reacciones de isomerización, en las que se producen reordenamientos del esqueleto de carbono. Para simular su actividad catalítica se ha empleado derivados hidrofóbicos de la vitamina B<sub>12</sub>.

Ariga, et al. [205] construyen un electrodo modificado con derivados de la vitamina B<sub>12</sub>, que poseen un núcleo estructuralmente idéntico a la vitamina B<sub>12</sub> natural. El electrodo consiste en un monocapa de Langmuir de organoalquilsilano, en la que se inmoviliza los derivados de la vitamina.

Hernández, et al. emplearon un electrodo de carbono vitrificado sin modificar [206] en el rango de concentración de 0.1 - 1.2 mM de vitamina a pH 3.

Tomčík, et al. [207] proponen un electrodo de pasta de carbono autocatalítico, en el que el CPE se modifica con trans-1,2-dibromociclohexano actuando tanto como pasta aglutinante y material que facilita la detección electrocatalítica del analito, para la detección de vitamina B<sub>12</sub>. El electrodo opera en el rango 2 - 200 nM con un límite de detección 85 nM a pH 2.5. Se empleó para la cuantificación de la vitamina en varias matrices farmacéuticas.

La inmovilización de un derivado hidrófobo de la vitamina B<sub>12</sub> sobre la superficie de un electrodo de platino permite que esta catalice la electrolisis del bromuro de fenetilo [208].

Davies [209] estudia la reacción de la vitamina B<sub>12s</sub> con tres dibromuros diferentes; el cis-1,2-dibromociclohexano, el trans-1,2-dibromociclohexano y el 1,2-dibromobutano; tanto en medio

homogéneo como heterogéneo. Se emplea un electrodo de carbono vitrificado sin modificar y un electrodo de grafito pirolítico modificado con microgotas de dibromuro/dodecano.

En este caso [210] lograron un límite de detección de 1 nM para un intervalo de concentración de 4 nM - 40  $\mu$ M a pH 7. El estudio voltamperométrico de la vitamina se ha estudiado mediante la modificación de un electrodo de oro con una fina monocapa autoensamblada de ácido mercaptoacético. El electrodo modificado se aplicó en la determinación de la cantidad de B<sub>12</sub> en productos farmacéuticos.

Laguna, et al. [211] han estudiado el comportamiento electroquímico de la vitamina B<sub>12</sub> en líquidos iónicos. Para ello disuelven cantidades de vitamina en el líquido iónico [C<sub>4</sub>mim][OTf]/H<sub>2</sub>O (ca. 95/5% v/v; C<sub>4</sub>mim = 1-butil-3-metilimidazolio, OTf = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>). La presencia de una pequeña cantidad de agua es necesaria, debido a la insolubilidad de la vitamina B<sub>12</sub> en líquidos iónicos secos.

Dong, et al. [212] emplean la vitamina B<sub>12</sub> para modificar el electrodo de trabajo. El electrodo de trabajo se construye insertando un disco de carbono en una punta de pipeta de polipropileno desechable y sellándola con cola epoxi. La superficie del electrodo se modifica mediante electropolimerización. Finalmente se emplea para la determinación amperométrica de seis antioxidantes en frutas y verduras. Observando que la modificación con vitamina B<sub>12</sub> proporciona alta sensibilidad, buena repetibilidad y fácil uso.

Kuralay, et al. [213] emplearon un electrodo de lápiz de grafito modificado con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) y quitosan para determinación de B<sub>12</sub>. Alcanzaron un límite de

detección de 0.89 nM para una concentración lineal de 5 - 100 nM a pH 2.0. Se obtuvo un límite de detección un poco más alto, de 2.1 nM para un rango de concentración lineal de 5 - 80 nM a pH 5.0. El electrodo propuesto se utilizó para la cuantificación de vitamina en productos farmacéuticos.

Kreft, et al. [58] utilizaron un substrato de cobre modificado mediante un film de bismuto para la detección electroquímica de la vitamina B<sub>12</sub>. Obtuvieron un límite de detección de 33 nM para un intervalo de concentración lineal de 0.1 - 1 μM a pH 12. El electrodo modificado se propuso para utilizarlo en la cuantificación de B<sub>12</sub> en productos farmacéuticos.

Shishehbore [214] modifica un electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono (MWCNT) y un derivado de la hidroquinona para la determinación simultánea de B<sub>12</sub> y B<sub>9</sub>, en el rango de concentración lineal 6.2 - 7.5 μM de B<sub>12</sub> y 5.3 - 62.5 μM de B<sub>9</sub>. Además se ha aplicado a muestras farmacéuticas con diferentes matrices.

El desarrollo de un biosensor microbiano [215] para la detección amperométrica de vitamina B<sub>12</sub> permite alcanzar un límite de detección de 0.016 mg L<sup>-1</sup> para un rango lineal de concentración de 0.1 - 10 μM. Para ello se inmoviliza en un solo paso la bacteria *Tetrasphaera duodecadis* por filtración a través de un filtro de celulosa con 0.15 μm de tamaño de poro, que funcionará como transductor.

Chen [216] emplea un electrodo modificado con nanogotas de vitamina B<sub>12</sub> que media en la reducción de oxígeno. Con ello, se estudia el mecanismo de reducción del oxígeno.

En la Tabla 5 se muestra un resumen de las referencias descritas en función del electrodo de trabajo empleado así como el rango de concentración y el límite de detección de la vitamina B<sub>12</sub>.

**Tabla 5. Resumen de los diferentes procedimientos de determinación de B<sub>12</sub> mediante electroquímica.**

<b>Electrodo</b>	<b>Concentración</b>	<b>LOD</b>	<b>Ref.<sup>a</sup></b>
GCE	0.1 – 1.2 mM		[206]
DBCH/CPE	2 – 200 nM	85 nM	[207]
MAA/SAM/Au	4 nM – 40 μM	1 nM	[210]
SWCNTs/chitosan	5 – 100 nM 5 – 80 nM	0.89 nM 2.1 nM	[213]
BiFE/Cu	0.1 – 1 μM	33 nM	[58]
HTP-MWCNTs-CPE	6.2 – 7.5 μM		[214]
Biosensor ( <i>Tetrasphaera duodecadis</i> )	0.1 – 10 μM	0.016 mg L <sup>-1</sup>	[215]

## 7. Determinación de colorantes alimentarios

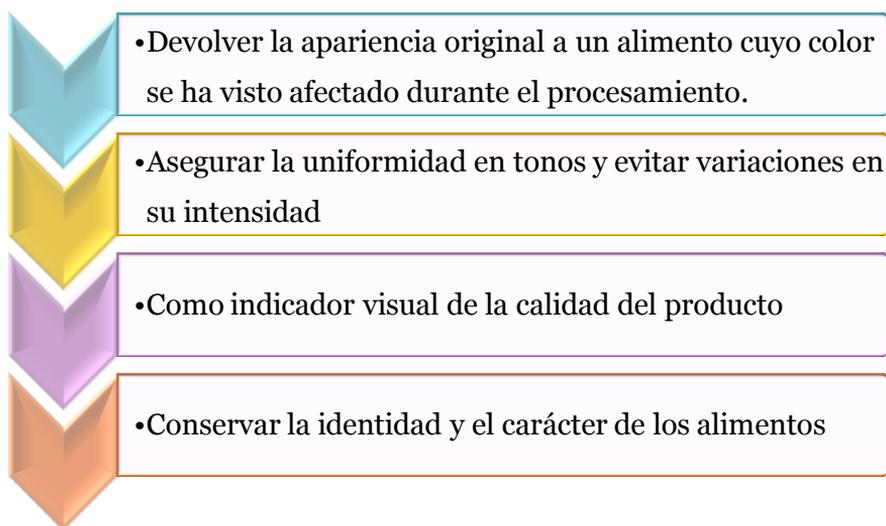
La industria alimentaria tiene una gran importancia en nuestra sociedad. Para satisfacer las expectativas de los consumidores, desarrollan más y más productos atendiendo a diferentes formatos, colores, sabores, olores y texturas. Entre los compuestos responsables de estas características se encuentran los aditivos, que en muchos de los casos aportan grandes beneficios al producto original [217]. El Reglamento n<sup>o</sup> 1333/2008/CE establece las clases funcionales de aditivos alimentarios usados en alimentos:

edulcorantes; colorantes, conservadores, antioxidantes, soportes, acidulantes, correctores de la acidez, antiaglomerantes, antiespumantes, agentes de carga, emulgentes, sales de fundido, endurecedores, potenciadores del sabor, espumantes, gelificantes, agentes de recubrimiento, humectantes, almidones modificados, gases de envasado, gases propelentes, gasificantes, secuestrantes, estabilizantes, espesantes, agentes de tratamiento de las harinas y potenciadores del contraste [218]. Las normativas vigentes exigen que los aditivos figuren en las etiquetas de los productos que los contienen. En estas etiquetas debe figurar la función del aditivo y su nombre o el número “E” asignado. La clasificación de los números E es la siguiente:

- Colorantes: E-100 a E-180
- Conservadores: E-200 a E-290
- Antioxidantes: E-300 a E-322
- Agentes emulsionantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes: E-400 a E-483
- Potenciadores del sabor: E-620 a E-637
- Edulcorantes: E-420, E-421 y E-950 a E-969
- Antiapelmazantes: E-504 a E-572
- Reguladores del pH: E-260, E-270, etc.
- Gasificantes: E-290, E-503, etc.
- Otros

La apariencia y el color son factores muy importantes para que el consumidor acepte o rechace un alimento, por ello han de cuidarse mucho. Los colores pueden deberse a diferentes compuestos, algunos se producen durante el manejo de los alimentos aunque en la mayoría de los casos se deben a la presencia de pigmentos. Los

motivos por los cuales la industria alimentaria emplea colorantes son:



**Figura 5. Fines de la utilización de colorantes.**

De acuerdo con su origen o procedencia, los aditivos de color se clasifican en tres grupos: naturales, idénticos a naturales y sintéticos. Estos últimos proporcionan una mayor intensidad de coloración a los alimentos, son baratos, existe gran gama de colores y son muy estables.

Algunos de estos colorantes sintéticos son peligrosos para el ser humano, y han sido prohibidos por las autoridades correspondientes [219]. Sin embargo, se puede afirmar que ciertos colorantes autorizados presentan toxicidad a altas dosis, estando tanto su empleo y dosis muy controladas. El Reglamento nº 1129/2011 recoge en el grupo III los colorantes alimentarios con límites máximos, que son: curcumina, tartrazina, amarillo de quinoleína, amarillo oca FCF, ácido carmínico, azorrubina, ponceau 4R, rojo allura AC, azul patente V, carmín de índigo, azul

brillante FCF, verde S, negro brillante BN, marrón HT, beta-apo-8'-carotenal y luteína [220].

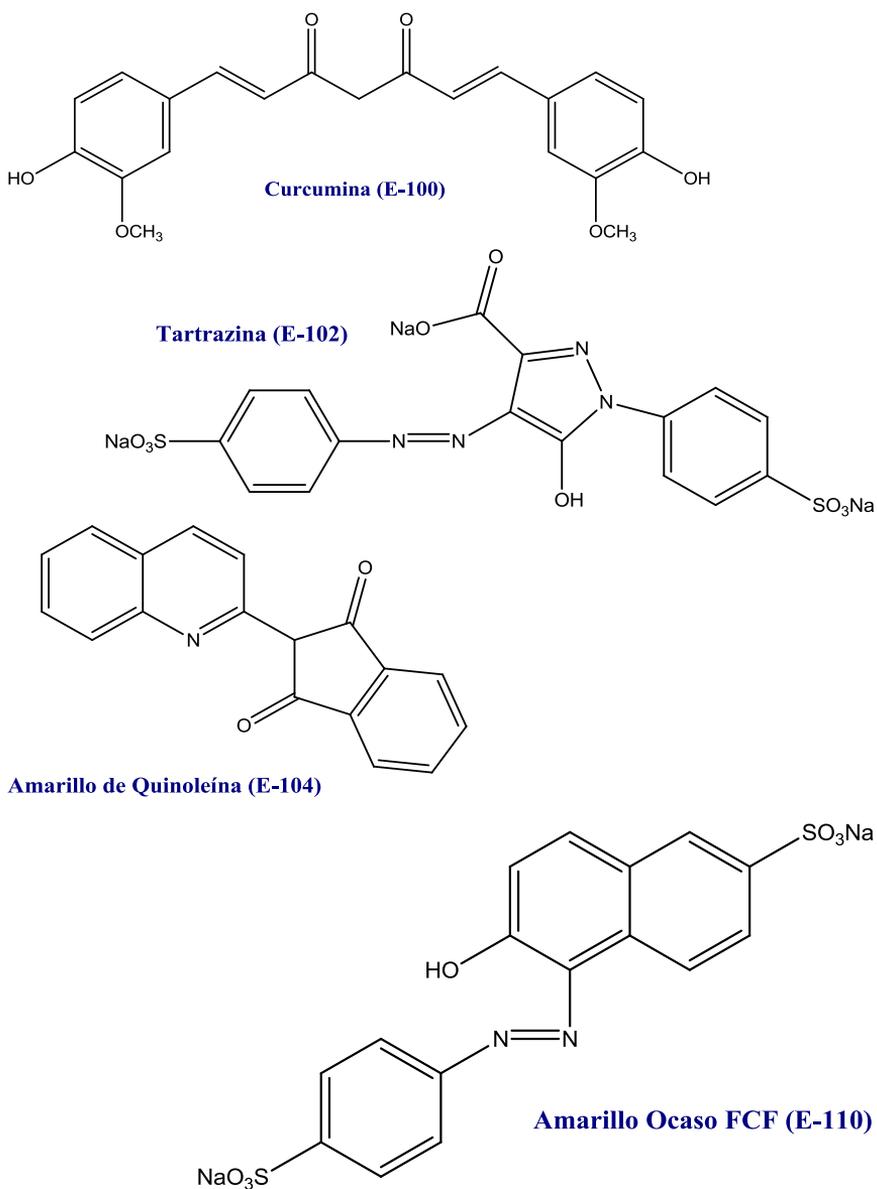
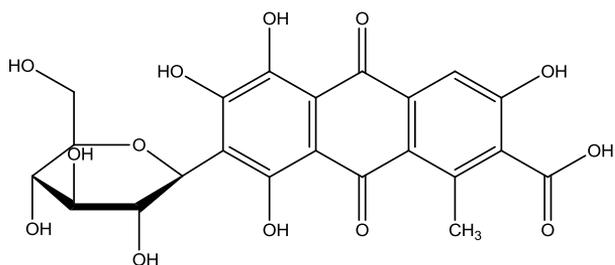
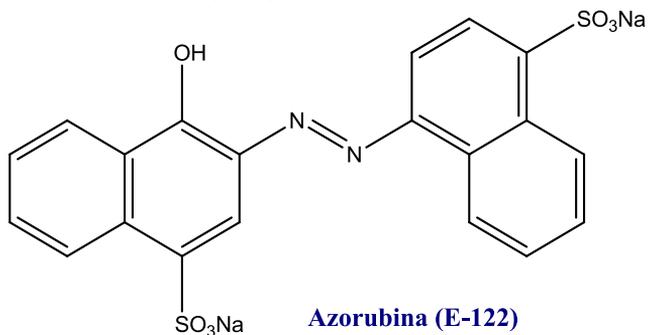


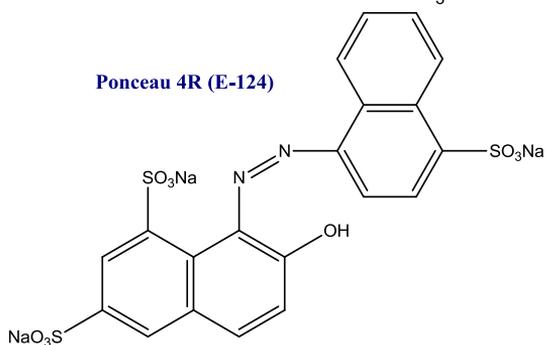
Figura 6. Estructura química de la curcumina, tartrazina, amarillo de quinoleína y amarillo ocaso FCF.



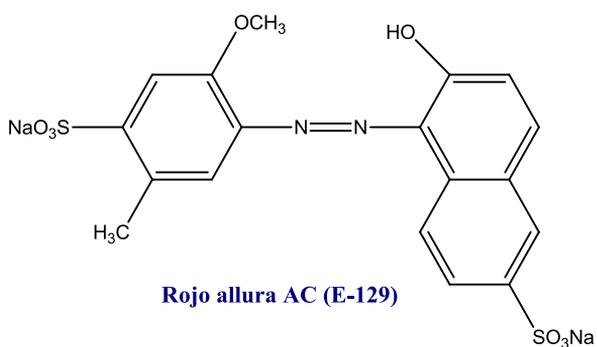
ácido carmínico (E-120)



Azorubina (E-122)

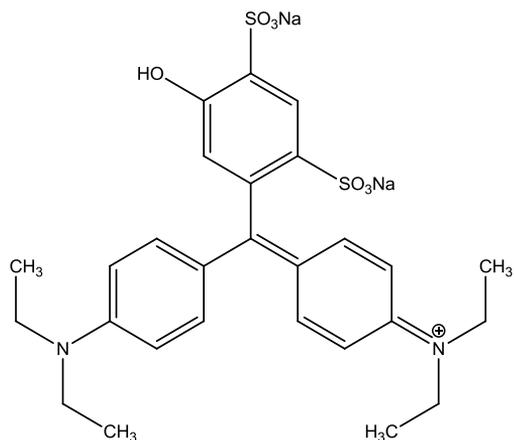


Ponceau 4R (E-124)

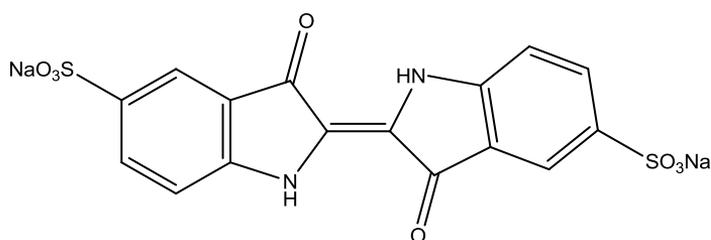


Rojo allura AC (E-129)

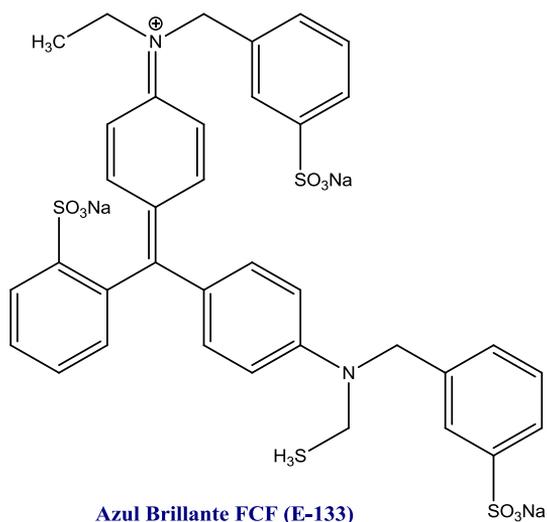
Figura 7. Estructura química del amarillo ocaso FCF, ácido carmínico, azorubina, ponceau 4R y rojo allura AC.



**Azul Patente V (E-131)**

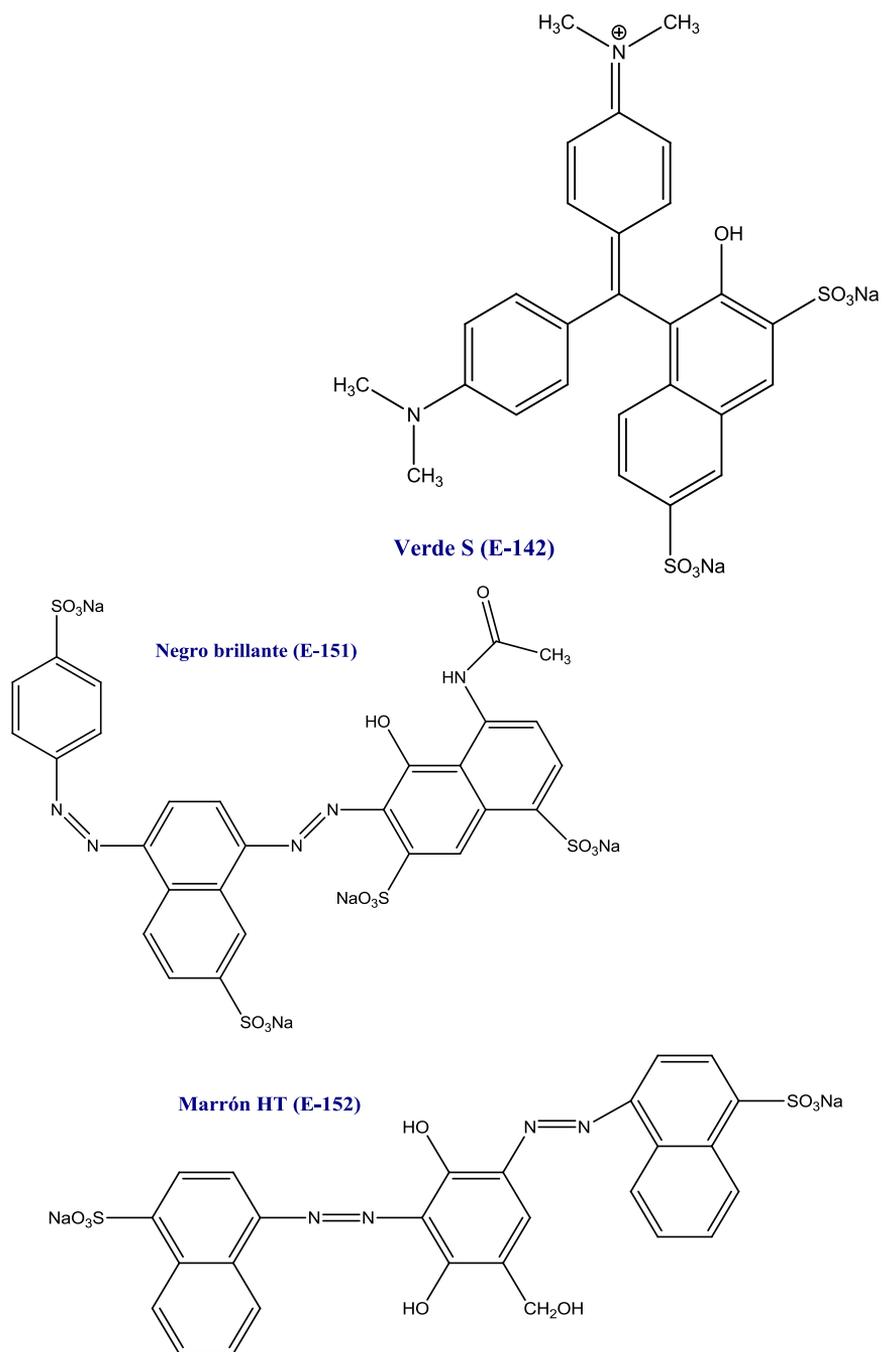


**Carmín de índigo (E-132)**

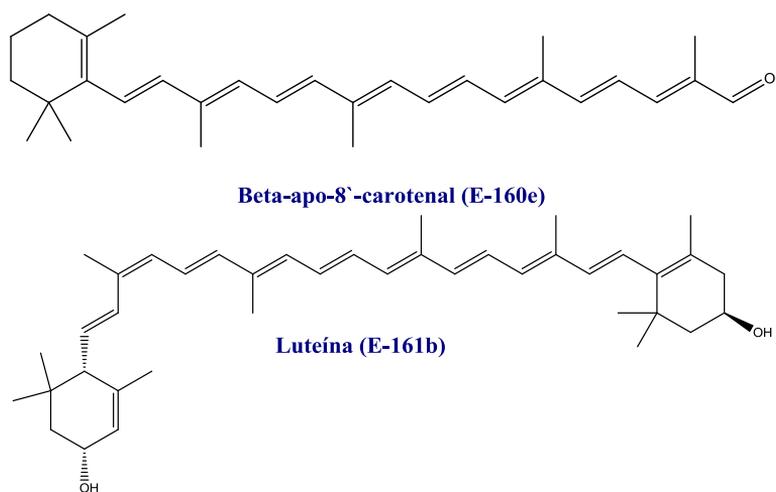


**Azul Brillante FCF (E-133)**

**Figura 8. Estructura química del azul patente V, carmín de índigo y azul brillante FCF.**



**Figura 9. Estructura química del Verde S, negro brillante y marrón HT.**



**Figura 10. Estructura química del Beta-apo-8'-carotenal y luteína.**

En los últimos años se han publicado numerosos estudios en los que se intenta correlacionar algunos de los pigmentos anteriormente mencionados con el posible desarrollo de trastorno de déficit de atención con hiperactividad, alergias, asma, etc. Sin embargo, los resultados obtenidos en dichos estudios no han podido demostrar verazmente dicha relación [221,222]. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda a los fabricantes de alimentos indicar en la etiqueta al colorante como posible causa de hiperactividad [152].

En la bibliografía se puede encontrar diversas formas de determinación de los colorantes. Las más utilizadas son las técnicas cromatográficas: HPLC [223–228], espectrofotométricas [229–238], espectroscopía raman [239–243], fluorescencia [244] y electroquímicas.

A continuación se describe el estado del arte para la determinación de diferentes colorantes mediante técnicas electroquímicas. Las técnicas electroquímicas empleadas en la bibliografía son

voltamperometrías de redisolución, bien de onda cuadrada o diferencial de pulsos y polarografía diferencial de pulsos (DPP).

S. Chanlon, et al. [245] llevaron a cabo la determinación de azorrubina, rojo allura y ponceau 4R mediante DDP, empleando un electrodo de gota de mercurio.

Zifei Wang, et al. [246] determinan el colorante E-124 o Ponceau 4R por DPSV. El electrodo empleado consiste en un material compuesto de PEDOT: PSS [poli(3,4-etilendioxitiofeno):Poli(estireno sulfonato)] sobre un GCE y una posterior modificación con SWCNTs.

Yuanyuan Zhang, et al. [247] emplean un sensor electroquímico basado en microfibras de alúmina para la determinación de ponceau 4R y tartrazina. Las microfibras de alúmina se preparan mediante una reacción hidrotermal, empleándose posteriormente para modificar un CPE.

Xiaofeng Yang, et al. [248] determinan el ponceau 4R y la tartrazina. El GCE se modifica con 5  $\mu\text{L}$  de una dispersión de DHP (dihexadecil hidrógeno fosfato) y AB (acetylene black).

Xinlan Qiu, et al. [249] desarrollan un dispositivo desechable basado en un nanomaterial compuesto de óxido de grafeno y MWCNTs. Con él determinan amarillo ocaso y tartrazina.

La determinación de ponceau 4R y amaranto [250] utilizando un electrodo de pasta de grafito expandido (EGPE).

Yu Zhang, et al. [251] preparan una suspensión de MWCNTs y DHP en agua que emplean para recubrir con una gota (5  $\mu\text{L}$ ) la superficie de un GCE. Con este sensor se determina ponceau 4R y rojo allura.

M. Florian, et al. [252] llevan a cabo la determinación de azul brillante FCF en presencia y ausencia de eritrosina y amarillo de

quinoleína mediante técnicas de redisolución usando un electrodo de mercurio, un HMDE.

Ghoreishi, Behpour y Golestaneh [253] determinaron simultáneamente azul brillante y tartrazina en muestras reales. El electrodo se prepara mezclando grafito y MWCNT, con la pasta resultante se forma el CPE.

Asadpour-Zeynali y Mollarasouli [59] prepararon un electrodo de película de bismuto sobre un GCE mediante el método ex-situ para la determinación de amarillo ocaso y azorrubina.

Ni, Bai y Jin [254] emplearon un HMDE para determinar amarillo ocaso, amaranto, tartrazina y ponceau 4R.

El uso de un HMDE [255] como electrodo de trabajo permitió la determinación de amanto y amarillo ocaso.

Berzas, Flores y Villaseñor [256] se valieron de un HMDE para la determinación de trazas de amarillo ocaso.

Combeau, et al. [257] analizaron azorrubina, rojo allura y ponceau 4R mediante DPP. El electrodo de trabajo empleado fue un HMDE.

En este trabajo Silva, et al. [258] describen la construcción de un GCE modificado con polialilamina y su aplicación en la electroreducción de tartrazina, amarillo ocaso y allura red por SWV.

Królicka, et al. [259] electrodepositan el bismuto sobre un GCE por el método ex-situ, para la determinación de amarillo ocaso FCF en bebidas.

Desimoni, Brunetti y Cosio [260] emplean un GCE, cuya superficie se ha recubierto con 3  $\mu$ L de nafión para determinar el azul patente.

Tain Gan, et al. [261] sintetizan el óxido de grafeno reduciéndolo químicamente con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) hasta obtener grafeno reducido. El GCE se modifica electroquímicamente introduciéndolo en una disolución de PTA (ácido fosfotúngstico) y grafeno en agua y barriendo entre  $-0.85$  v a  $0.3$  V. Este electrodo permite la determinación de amarillo ocaso y tartrazina.

Song, et al. [262] emplean un electrodo de grafito pirolítico modificado con MWCNTs para la reducción electroquímica de tartrazina. El PGE se recubre con  $4 \mu\text{L}$  de una suspensión de MWCNTs en dimetilformamida (DMF).

El empleo de un electrodo de diamante dopado con boro (BDDE) [263] permite la determinación de mezclas de tartrazina y amarillo ocaso y azul brillante y amarillo ocaso. Medeiros, et al. [264] acoplan este BDDE a un sistema de flujo para la determinación de colorantes sintéticos. Las mezclas analizadas son las anteriormente mencionadas.

Ghoreishi, et al. [265] modifican un electrodo de pasta de carbono con AuNPs, sintetizadas químicamente. Se utiliza para la determinación de amarillo ocaso y tartrazina mediante DPV.

Gómez, et al. [266] emplean un HMDE para la determinación de tartrazina y amarillo ocaso en muestras reales por AdSV en presencia de bromuro de cetilpiridinio (CPB).

Sierra Rosales, et al. [267] presentan un GCE que ha sido modificado con MWCNTs. El nanotubos de carbono se dispersan en 1,3-dioxolano como agente dispersante. Este electrodo permite determinar tartrazina, amarillo ocaso y azorrubina.

Gan, et al. [268] sintetizan GO siendo posteriormente reducido químicamente con  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{TiO}_2$  mesoporoso. Con el GN y el  $\text{TiO}_2$

preparan una pasta con la que fabricaran el CPE usándolo para determinar ponceau 4R y rojo allura.

Ye, et al. [269] preparan un material compuesto de grafeno funcionalizado con poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA) recubierta con  $\beta$ -ciclodextrina (CD) para modificar la superficie de un GCE. Con ello llevan a cabo la determinación de amarillo ocaso y tartrazina.

Gan, et al. [270] preparan un electrodo con nanohojas de grafeno decoradas uniformemente con nanopartículas de níquel (NiNPs). Esto permite medir tartrazina y amarillo ocaso por SWV.

Zhao, Zeng y Zhao [271] emplean un electrodo con un polímero impreso, MWCNTs y un líquido iónico con nanopartículas de platino (PtNPs) para determinar tartrazina.

La exfoliación de grafito y su posterior dispersión en DMF permiten modificar la superficie de un GCE. Con ello, Song, et. al [272] estudian la reducción de la tartrazina.

Meiling Wang, et al. [273] describen la modificación de un GCE con CNTs y polipirrol (ppy) para la determinación simultánea de amaranto y ponceau 4R.

La determinación simultánea [274] de tartrazina y amarillo ocaso se lleva a cabo con un electrodo modificado con óxido de grafeno reducido funcionalizado con un líquido iónico que contiene AuNPs.

Wang, et. al [275] desarrollan un electrodo para la determinación electroquímica de amarillo ocaso. El electrodo consiste en un GCE, al que se le modifica su superficie con grafeno reducido y AuNPs.

Sun, et al. [276] describen un sensor electroquímico basado en un CPE modificado con una resina de formaldehído y resorcinol nanoestructurado (RF). Con el determinan amarillo ocaso.

Yang y Li [277] desarrollan un GCE modificado con MWCNTs y óxido de grafeno funcionalizado con bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB). Con ello, llevan a cabo la determinación simultánea de amarillo ocaso y tartrazina.

Arvand, et al. [278] presentan un novedoso dispositivo para determinar colorantes sintéticos basados en un nanocompuesto magnético. El electrodo se basa en MWCNTs que han sido decorados con un núcleo magnético de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ , que se emplean para fabricar un CPE modificado.

Rovina, et al [279] emplean un electrodo de oro (AuE) que se modifica con quitosan, nanopartículas de óxido de calcio (CaONPs) y MWCNTs para determinar amarillo ocaso.

Ji, et al. [280] desarrollan un método simple y rápido para determinar amarillo ocaso y tartrazina. Para ello construyen un dispositivo en el que el cobre (Cu) actúa como centro y el ión 1, 3, 5-benzenotricarboxilato ( $\text{BTC}^{3-}$ ) actúa como ligando.

Deng, et al. [281] llevan a cabo la determinación de amarillo ocaso y tartrazina empleando un GCE modificado con nanoláminas de GO decoradas con nanobarras de oro (AuNRs).

La combinación que llevan a cabo Karim-Nezhad, et al. [282] con nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) y ácido p-aminobenzenosulfónico (p-ABSA) permite determinar fácilmente tartrazina.

Jampasa, et al. [283] presentan un sensor electroquímico basado en la modificación de un electrodo serigrafiado (SPE) con óxido de grafeno reducido electroquímicamente determinando amarillo ocaso y tartrazina.

Li, et al.[284] sintetizan un nuevo material impreso basado en óxido de grafeno magnético funcionalizado con  $\beta$ -ciclodextrina/líquido iónico/AuNPs. El electrodo construido se utiliza para determinar amarillo ocaso.

El empleo de un GCE [285] modificado con óxido de grafeno reducido y oro-paladio permite determinar amarillo ocaso. El óxido de grafeno se sintetiza mediante el método de Hummer's y posteriormente se reduce químicamente con citrato trisódico. A la mezcla se añade  $\text{HAuCl}_4$  y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  que se reduce químicamente con ácido ascórbico. La mezcla resultante se emplea para recubrir la superficie del GCE.

**Tabla 6. Resumen de los procedimientos de determinación electroquímica de colorantes.**

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref. <sup>a</sup>
Poly(EDOT-AA-co-EDOT):PSS-SWCNTs-PVA-GCE	E-124	0.0055 – 110.6 $\mu\text{M}$	1.8 nM	[246]
Microfibras de Alumina-CPE	E-124	1 – 100 nM	0.8 nM	[247]
	E102	5 – 140 nM	2.0 nM	
AB nanopartículas-GCE	E-124	0.05 – 4 mg $\text{Kg}^{-1}$	0.03 mg $\text{Kg}^{-1}$	[248]
	E102	0.15 – 18 mg $\text{Kg}^{-1}$	0.1 mg $\text{Kg}^{-1}$	
Nafión-GCE	E-131	$9.5 \cdot 10^{-8}$ – $9.9 \cdot 10^{-7}$ M	$7.6 \cdot 10^{-8}$ M	[260]
DME	E-122	0.02 – 4.0 5 mg $\text{L}^{-1}$	42 $\mu\text{g L}^{-1}$	[245]
	E-129	0.02 – 4.0 5 mg $\text{L}^{-1}$	34 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	E-124	0.02 – 4.5 mg $\text{L}^{-1}$	43 $\mu\text{g L}^{-1}$	
GO/MWCNTs-GCE	E-110	0.09 – 8 $\mu\text{M}$	0.025 $\mu\text{M}$	[249]
	E-102	0.09 – 8 $\mu\text{M}$	0.01 $\mu\text{M}$	
EGPE	E-124	0.06 – 4 $\mu\text{M}$	2 nM	[250]
	E-123	0.08 – 4 $\mu\text{M}$	36 nM	

## Revisión bibliográfica

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref. <sup>a</sup>
MWCNTs-GCE	E-124	25 µg L <sup>-1</sup> – 1.5 mg L <sup>-1</sup>	15 µg L <sup>-1</sup>	[251]
	E-129	50 µg L <sup>-1</sup> – 0.6 mg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>	
HMDE	E-133	8 – 80 µg L <sup>-1</sup>	1.53 µg L <sup>-1</sup>	[252]
	E-104	4 – 43 µg L <sup>-1</sup>	0.43 µg L <sup>-1</sup>	
	Eritrosina	10 – 70 µg L <sup>-1</sup>	1.13 µg L <sup>-1</sup>	
MWCNTs-GCE	E-133	0.05 – 22 µM	9 mM	[253]
	E-102	0.05 – 25 µM	5 mM	
BiFE-GCE	E-110	5 µM- 0.238 mM	4.52 µg mL <sup>-1</sup>	[59]
	E-122	5 µM- 0.238 mM	5.47 µg mL <sup>-1</sup>	
HMDE	E-102, E-110, E-123 y E-124	0.03 – 0.20 µg mL <sup>-1</sup>		[254]
HMDE	E-110 y E-123	0.03 – 0.16 µg mL <sup>-1</sup>		[255]
HMDE	E-110	5 -90 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	[256]
HMDE	E-122	0 -4 mg L <sup>-1</sup>	31 µg L <sup>-1</sup>	[257]
	E-124		38 µg L <sup>-1</sup>	
	E-129	0 -4.5 mg L <sup>-1</sup>	48 µg L <sup>-1</sup>	
Polialilamina	E-102		1.8 µM	[258]
	E-110	10 µM – 0.3 mM	3.5 µM	
	E-129		1.4 µM	
BiFE-GCE	E-110	4.4 – 87 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	[259]
Nafión-GCE	E-131	9.5 10 <sup>-8</sup> – 9.9 10 <sup>-7</sup> M	7.6 10 <sup>-8</sup> M	[260]
GN-PTA-GCE	E-102	60 µg L <sup>-1</sup> – 1.5 mg L <sup>-1</sup>	30 µg L <sup>-1</sup>	[261]
	E-110	15 – 300 µg L <sup>-1</sup>	0.5 µg L <sup>-1</sup>	
MWCNTs-PGE	E-102	2 – 70 mg L <sup>-1</sup> 70 – 230 mg L <sup>-1</sup>	0.5 mg L <sup>-1</sup>	[262]

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref. <sup>a</sup>
BDDE	E-102	0.0999– 5.66 $\mu\text{M}$	62.7 nM	[263]
	E-110	0.02 – 4.76 $\mu\text{M}$	13.1 nM	
	E-133	0.596 – 9.90 $\mu\text{M}$	143 nM	
	E-110	0.0999 – 4.76 $\mu\text{M}$	25.6 nM	
BDDE	E-102	5– 60 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	[264]
	E-110	1 – 50 $\mu\text{M}$	0.8 $\mu\text{M}$	
	E-133	5 –60 $\mu\text{M}$	3.5 $\mu\text{M}$	
	E-110	1 – 50 $\mu\text{M}$	0.85 $\mu\text{M}$	
nAu-CPE	E-102	0.05 – 1.6 $\mu\text{M}$	2 nM	[265]
	E-110	0.1 – 2 $\mu\text{M}$	0.03 $\mu\text{M}$	
HMDE	E-102	6.6 – 300 $\mu\text{g L}^{-1}$	3.3 $\mu\text{g L}^{-1}$	[266]
	E-110	3.3 – 160 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$	
MWCNT-GCE	E-102	1 -7 $\mu\text{M}$	0.22 $\mu\text{M}$	[267]
	E-110	0.55 -7 $\mu\text{M}$	0.12 $\mu\text{M}$	
	E-122	0.54 – 5 $\mu\text{M}$	0.11 $\mu\text{M}$	
GN/TiO <sub>2</sub> mesoporoso-CPE	E-124	0.00406 – 0.2 $\mu\text{M}$	1.35 nM	[268]
	E-129	0.00067 – 0.21 $\mu\text{M}$	0.34 nM	
$\beta$ -CD-PDDA-GN- GCE	E-102	0.05 – 20 $\mu\text{M}$	0.0143 $\mu\text{M}$	[269]
	E-110		0.0125 $\mu\text{M}$	
GN/NiNPs-GCE	E-102	6.24 – 624 nM	1.08 nM	[270]
	E-110	7.374 -442 nM	2.16 nM	
MIP-MWCNTs- ILPtNPs/GCE	E-102	0.03 – 5 $\mu\text{M}$ 5 – 20 $\mu\text{M}$	8 nM	[271]
Grafito-GCE	E-102	5 $\mu\text{g L}^{-1}$ – 0.2 mg L <sup>-1</sup>	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[272]
CNT/ppy-GCE	E-123	5 nM – 0.5 $\mu\text{M}$	0.5 nM	[273]
	E-124	8 nM – 1 $\mu\text{M}$	1 nM	
ILRGo-Au/GCE	E-102	4 nM - 1 $\mu\text{M}$	0.83 nM	[274]
	E-110	7 nM -1.5 $\mu\text{M}$	0.52 nM	

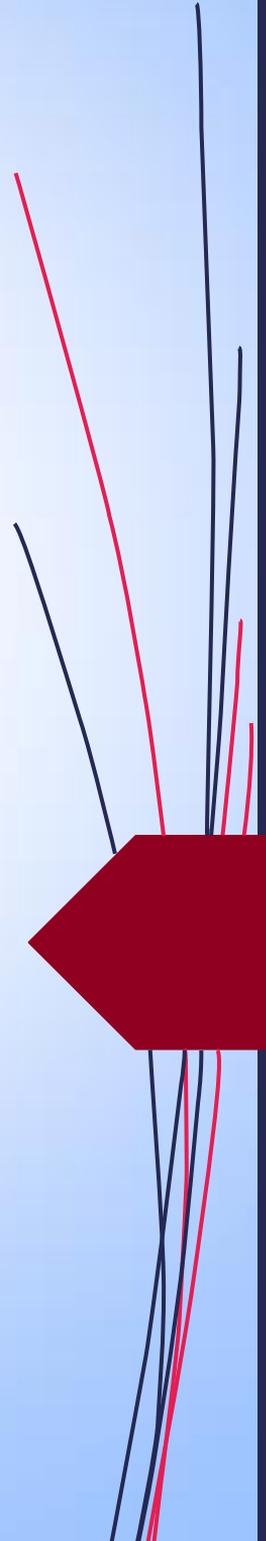
## Revisión bibliográfica

Electrodo	Analito	Concentración	LOD	Ref. <sup>a</sup>
Au/RGO/GCE	E-110	0.002 – 109.14 $\mu$ M	2 nM	[275]
RF-CPE	E-110	0.3 – 125 nM	0.09 nM	[276]
CTAB- GO/MWCNTs	E-102	0.03 – 0.6 $\mu$ M	5 nM	[277]
	E-110	0.1 – 20 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> /M WCNTs-CPE	E-102	0.5 – 100 $\mu$ M	0.04 $\mu$ M	[278]
	E-110		0.05 $\mu$ M	
CHIT/CaONPs/ MWCNTs-AuE	E-110	0.9 – 10 ppb	0.8 ppb	[279]
Cu-BTC/CPE	E-102	1 – 100 nM	0.14 nM	[280]
	E-110	0.3 – 50 nM	0.05 nM	
ERGO- AuNRs/GCE	E-102	0.03 – 6 $\mu$ M	8.6 nM	[281]
	E-110	0.01 – 3 $\mu$ M	2.4 nM	
Pp- ABSA/ZnONPs- CPE	E-102	0.349 – 5.44 $\mu$ M	80 nM	[282]
ERGO-SPCE	E-102	0.02 – 20 $\mu$ M	4.50 nM	[283]
	E-110	0.01 – 20 $\mu$ M	0.50 nM	
MGO/ $\beta$ - CD/IL/AuNPs- GCE	E-110	5 nM – 2 $\mu$ M	2 nM	[284]
Au-Pd- RGO/GCE	E-110	0.686 – 336.686 $\mu$ M	1.5 nM	[285]





*Experimental*





# *Capítulo 1*



## 1. Nanofibras de carbono (CNFs)

### 1.1. Primeros pasos

Como se ha comentado anteriormente las nanofibras de carbono poseen unas propiedades muy similares o incluso superiores a los nanotubos de carbono para algunas aplicaciones, siendo éstas más baratas.

Un problema añadido a la hora de preparar dispersiones de CNTs es su difícil dispersión, ya que requieren la presencia de surfactantes que podrían interferir posteriormente en la determinación de los analitos. Además actualmente se está sustituyendo estos dispersantes por disolventes orgánicos, bastante tóxicos.

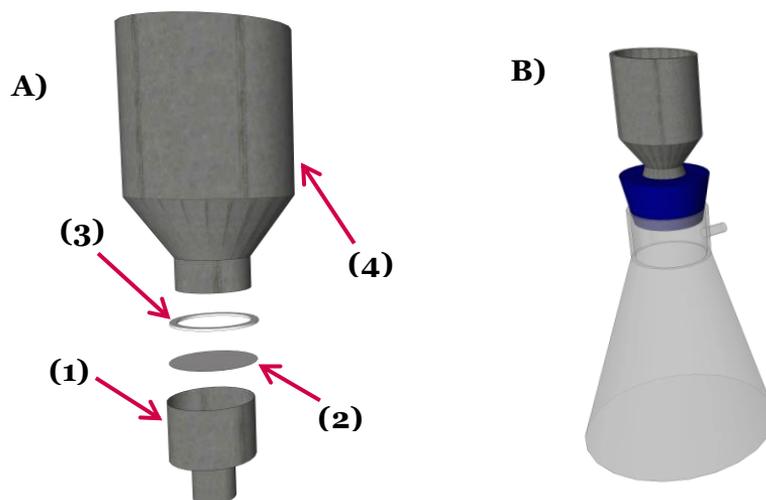
Esto no ocurre con las nanofibras, ya que se dispersan con bastante facilidad y es por ello que se van a buscar medios baratos y con baja toxicidad para llevar a cabo su dispersión.

#### 1.1.1. Primeras pruebas en la fabricación de electrodos de CNFs

Para las primeras pruebas realizadas con CNFs se emplean dos disolventes alcohólicos: el metanol y el etanol. Dispersando pequeñas cantidades de nanofibras en ambos medios y sometiendo a las mismas condiciones de dispersión, se observó que las dispersiones en metanol no eran homogéneas caso contrario a lo que ocurre en etanol.

Se decide preparar dispersiones de  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  de CNFs, eligiendo como dispersante el etanol por su bajo coste y su baja toxicidad.

Para ello se pesa la cantidad correspondiente y se dispersa durante 3 horas en un ultrasonidos (VWR). Una vez que las CNFs están bien dispersadas se procede a fabricar el electrodo de trabajo. Se ha diseñado un sistema que consiste en filtrar los CNTs o CNFs a través de filtros de 13 mm de diámetro y diferentes materiales (teflón, nitrocelulosa o nylon) y tamaños de poro para posteriormente transferir o pegar sobre una lámina de PET [286].



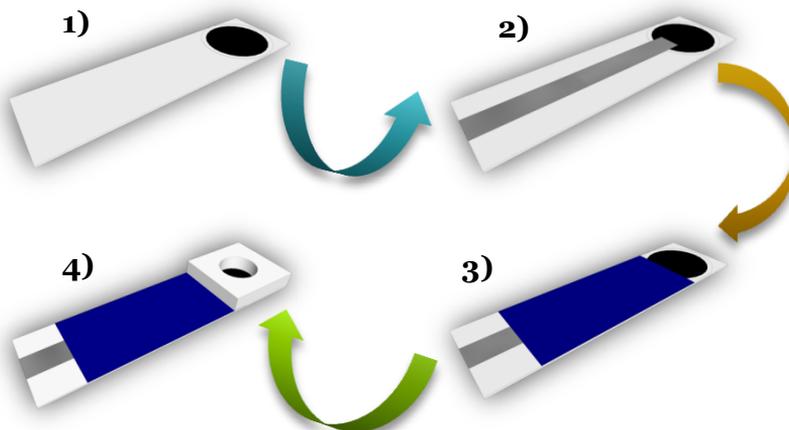
**Figura 11. A) Esquema del sistema de filtrado: (1) Pieza del sistema de filtrado, (2) Filtro, (3) Arandela y (4) Pieza del sistema de filtrado; B) Sistema de filtración.**

Una vez obtenido los filtros, con las CNFs o CNTs adheridas sobre él, se deben pegar a la lámina de plástico o transferirlos para lo cual se utiliza una prensa aplicando diferentes presiones y tiempos siendo también determinante el tiempo de secado del filtro.

Los resultados obtenidos con diferentes materiales en los filtros: teflón, nitrocelulosa y nylon, nos permiten concluir que el mejor material para las CNFs es el teflón con un tamaño de poro de 0.1  $\mu\text{m}$ . Por lo que será el material seleccionado para preparar los electrodos de nanofibras de carbono utilizados en esta tesis.

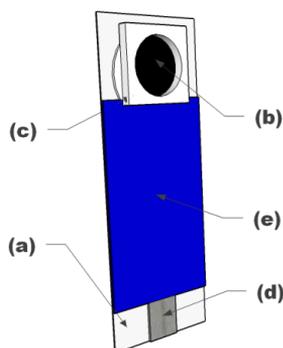
El proceso para fabricar el electrodo es el siguiente:

1. Se pega el filtro sobre una lámina de PET empleando pintura aislante comercial. Con cuidado se aplica una pequeña cantidad alrededor de la zona blanquecina que queda después de filtrar las CNFs. Para curarla se introduce en la estufa 2 horas a 75°C.
2. Los contactos eléctricos se pintan con una pintura de plata comercial. Para secar la pintura se deja 45 min en la estufa a 75°C.
3. Se aíslan los contactos eléctricos con pintura aislante comercial. Con un trozo de PET se aplica con cuidado una fina capa de aislante que se va a curar posteriormente durante 2 horas a 75°C.
4. Se delimita el área del electrodo con una pieza de teflón en cuyo centro hay un orificio de 5.22 mm de diámetro. Se aplica una pequeña cantidad de pintura aislante en la pieza, se pega sobre el filtro y se deja secar.



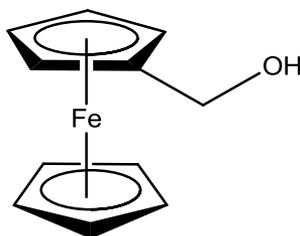
**Figura 12. Secuencia de pasos en el proceso de fabricación del electrodo de trabajo: 1) Fijado del filtro, 2) Pintado de los contactos eléctricos, 3) Aislamiento y 4) Delimitación del área.**

El electrodo resultante es el que se muestra en la Figura 13.



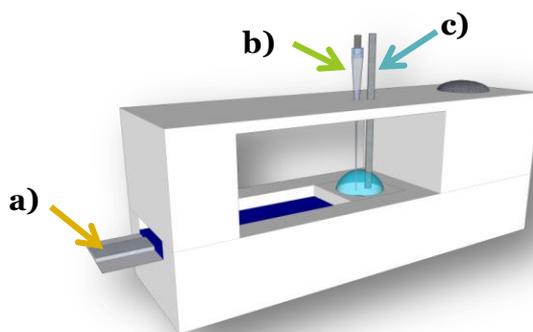
**Figura 13. Electrodo de trabajo: a) Lámina de PET, b) Filtro de teflón con las nanofibras filtradas, c) Chapa de teflón, d) Pintura de plata y e) Capa aislante.**

Se llevan a cabo diversas experiencias fijando la cantidad de nanofibras de carbono a filtrar. Para ello, se emplean diseños de experimentos en los que se fijan dos variables: la presión ejercida por la prensa y el tiempo de secado del filtro, siendo la respuesta la intensidad de pico obtenido con ferrocenometanol.



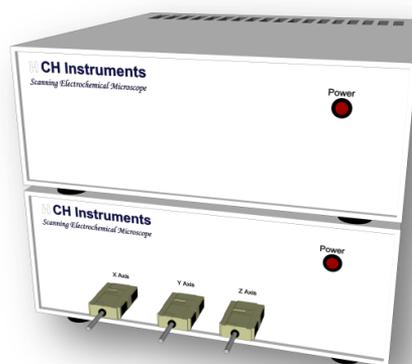
**Figura 14. Estructura del ferrocenometanol.**

La celda empleada para llevar a cabo las experiencias (Figura 15) es una celda diseñada por nosotros que permite utilizar poca cantidad de la disolución del analito así como mantener fija la posición del electrodo de referencia y el contraelectrodo.



**Figura 15.** Celda empleada para la determinación de ferrocenometanol: a) Electrodo de trabajo, b) Electrodo de referencia y c) Contraelectrodo

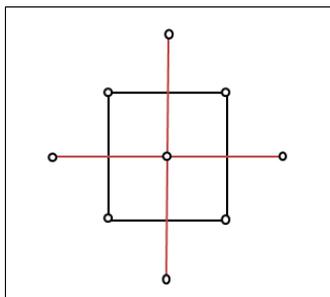
El equipo empleado será un potenciostato/galvanostato CHI 900 (CH Instruments) como el de la Figura 16.



**Figura 16.** Potenciostato/galvanostato CHI 900 (CH Instruments).

*1.1.1.1. Diseño de experimentos para electrodos añadiendo 200  $\mu$ L de CNFs*

Con el fin de obtener los valores óptimos para la presión ejercida por la prensa, P (tons), y el tiempo de secado del filtro,  $t_{sec}$ , se realiza un diseño central compuesto estrella  $2^2$ .



**Figura 17. Esquema de un diseño central compuesto estrella,  $2^2$  con 3 réplicas en el punto central.**

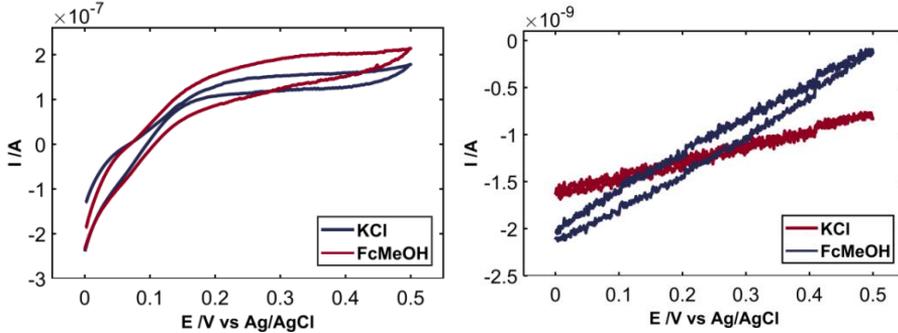
El volumen de nanofibras de carbono a filtrar se fija en  $200 \mu\text{L}$  de la dispersión  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ . En total se obtiene un diseño con 11 experiencias en el que la señal electroquímica del ferrocenometanol,  $I_p$ , se tomará como variable respuesta del diseño.

**Tabla 7. Diseño de experimentos central compuesto  $2^2 + 3$  réplicas en el punto central para  $200 \mu\text{L}$  de CNFs.**

Experimento	$t_{\text{sec}}$ , min	P, tons	$I_p$
1	10	20	
2	10	5	
3	7.5	12.5	
4	7.5	23.11	
5	7.5	12.5	
6	5	20	
7	7.5	12.5	
8	7.5	1.89	
9	11.04	12.5	
10	3.96	12.5	
11	5	5	

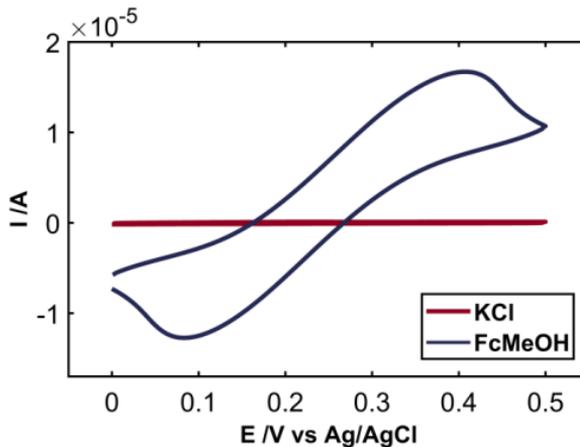
Con el diseño se obtienen 11 electrodos transferidos y también se van a pegar los filtros prensados para obtener otros 11 electrodos, debido a que en anteriores pruebas los filtros tenían más cantidad de nanofibras que las que se transferían.

Tras medir los electrodos transferidos con ferrocenometanol 0.6 mM y 0.1 M KCl, no se ha podido observar apenas ninguna señal del analito.



**Figura 18. Señal electroquímica del ferrocenometanol obtenida en el diseño de experimentos para un volumen de nanofibras de 200  $\mu$ L transferidas a un lámina de PET.**

Sin embargo, con los electrodos fabricados con los filtros si se observa la señal típica del ferrocenometanol. Si bien, las señales obtenidas no son lo suficientemente buenas, ya que como se observa en la Figura 19 los picos del analito no están bien definidos.



**Figura 19. Señal electroquímica del ferrocenometanol obtenido en el diseño de experimentos para un volumen de 200  $\mu$ L nanofibras de carbono en el filtro fijado sobre una lámina de PET.**

Analizando los resultados obtenidos para los electrodos con el filtro fijado a una lámina de PET, se extraen los valores de intensidad de pico tanto para las señales de oxidación como para las de reducción. Los valores se introducen en el software Statgraphics [287] y se analiza el diseño de experimentos. El Anova, Tabla 8, muestra la variabilidad para cada una de las variables. En este caso, 3 efectos, el  $t_{sec}$ , su interacción consigo misma y la interacción de P consigo misma y la interacción de  $t_{sec}$  con P. En este caso solo la interacción de la presión consigo misma tiene un valor-p menor de 0.05, indicando que es significativamente diferente de cero a un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 8. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:tiempo	2.36E-12	1	2.36E-12	0.06	0.812
B:presión	5.39E-14	1	5.39E-14	0.00	0.971
AA	4.93E-11	1	4.93E-11	1.31	0.304
AB	1.05E-10	1	1.05E-10	2.79	0,156
BB	3.88E-10	1	3.88E-10	10.31	0.024
Error total	1.88E-10	5	3.76E-11		
Total (corr.)	6.85E-10	10			

$R^2 = 72.55$  por ciento.

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 45.09 por ciento.

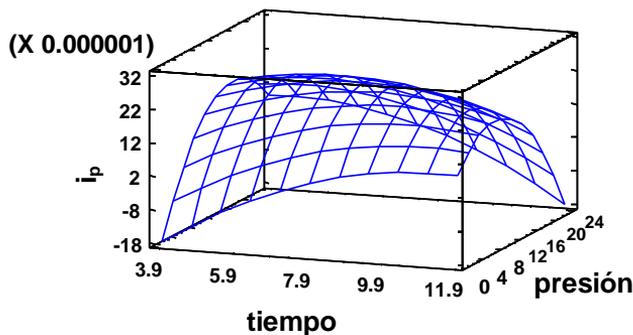
El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado, explica el 72.55% de la variabilidad en  $I_p$ . El estadístico  $R^2$  ajustado, que es el más adecuado para comparar modelos cuando tienen el número de variables independientes diferente, es 45.09%.

**Tabla 9. Efectos estimados para  $I_p$  (A).**

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	2.41E-05	3.54E-06	
A:tiempo	1.09E-06	4.34E-06	1.0
B:presión	-1.64E-7	4.34E-06	1.0
AA	-5.91E-06	5.16E-06	1.095
AB	-1.02E-05	6.13E-06	1.0
BB	-1.66E-05	5.16E-06	1.095

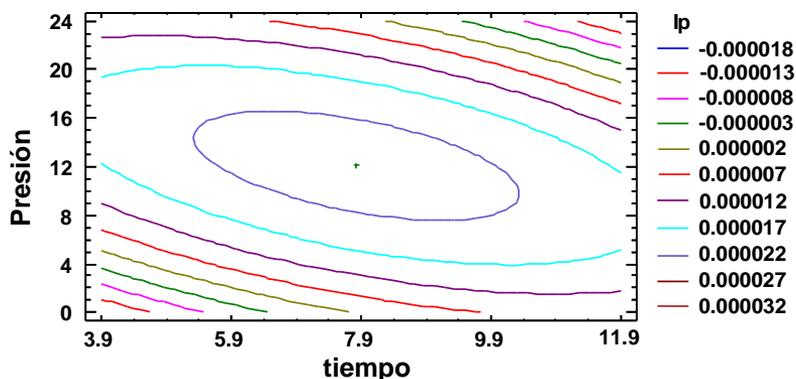
La Tabla 9, muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. El factor de inflación de varianza (VIF) más grande, es igual a 1.095. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los VIF serían igual a 1.

La Figura 20 muestra la gráfica de superficie para la intensidad de pico como una función del tiempo y la presión. Puede notarse que la variable tiempo tiene un efecto positivo, presentando una gran influencia. Igualmente, se observa que la presión ejerce un efecto significativo. Se obtiene mejor respuesta para tiempo de secado,  $t_{sec}$ , próximo a 7.9 s y para una presión, P, de 12 tons.



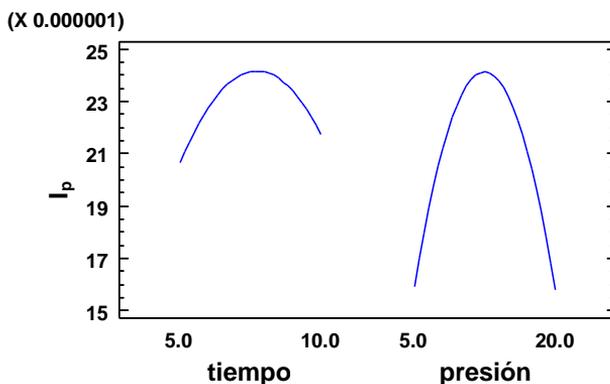
**Figura 20. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto  $2^2$ .**

Este mismo resultado se puede observar en la Figura 21, que muestra la proyección bidimensional de la superficie de respuesta estimada para el tiempo y la presión. Los puntos dentro de las elipses de la figura representan el valor óptimo.



**Figura 21. Superficie de respuesta estimada para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 22 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos. Se puede apreciar que el efecto del tiempo y de la presión sobre el sistema no es lineal. En el rango estudiado para ambos efectos, se observa que un aumento en el valor de la presión y el tiempo permite obtener valores de intensidad de pico mayores.



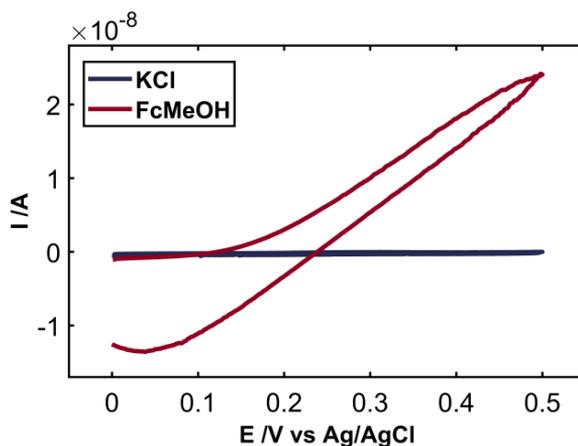
**Figura 22. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

Según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas en el proceso de diseño de los electrodos añadiendo un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de CNFs de cada factor experimental son:

$$t_{\text{sec}} = 7.83 \text{ s y } P = 12.16 \text{ tons}$$

### 1.1.1.2. Diseño de experimentos para electrodos añadiendo 400 $\mu\text{L}$ de CNFs

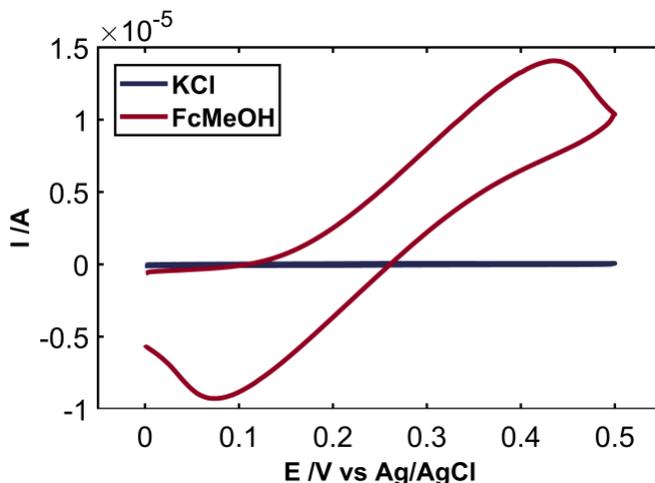
A la vista de estos resultados, se decide llevar a cabo el mismo diseño de experimentos que el de la Tabla 7, pero filtrando 400  $\mu\text{L}$  de CNFs. Se construyen los electrodos con las nanofibras transferidas y se van a pegar los filtros prensados debido a que tienen bastantes CNFs adheridas, empleándose para medir ferrocenometanol.



**Figura 23. Señal electroquímica del ferrocenometanol obtenida con los electrodos del diseño de experimentos para un volumen de CNFs de 400  $\mu\text{L}$  transferidas a una lámina de PET.**

Las experiencias obtenidas para los electrodos de 400  $\mu\text{L}$  de CNFs y cuyo filtro se pegó sobre una lámina de PET tampoco arrojaron unos resultados satisfactorios. Si bien se comprobó que el electrodo era conductor, aunque la señal del analito sigue sin salir

adecuadamente quizás porque no hay suficiente material de carbono o no están bien interrelacionadas las fibras y tienen una baja conducción.



**Figura 24.** Señal electroquímica del ferrocenometanol obtenida con los electrodos del diseño de experimentos para un volumen de 400  $\mu$ l de CNFs para los filtros fijados a la lámina de PET.

Con la información obtenida de las experiencias con los filtros de 400  $\mu$ L de CNFs fijados a la lámina de PET para los distintos electrodos del diseño, se van a analizar los resultados obtenidos. Los valores se introducen en el software Statgraphics y se analiza el diseño de experimentos. El Anova, Tabla 10, muestra la variabilidad para cada una de las variables. En este caso, 3 efectos, el  $t_{\text{sec}}$ , su interacción consigo misma y la interacción de P consigo misma y la interacción de  $t_{\text{sec}}$  con P. En este caso solo la interacción del tiempo de secado consigo mismo tiene un valor-p menor de 0.05, indicando que es significativamente diferente de cero a un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 10. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:tsecado	3.60E-10	1	3.60E-10	8.87	0.031
B:presión	9.34E-11	1	9.34E-11	2.30	0.190
AA	6.51E-12	1	6.51E-12	0,16	0.706
AB	4.68E-12	1	4.68E-12	0,12	0.748
BB	1.19E-14	1	1.19E-14	0.00	0.987
Error total	2.03E-10	5	4.06E-11		
Total (corr.)	6.68E-10	10			

$R^2 = 69.61$  por ciento

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 39.21 por ciento

El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado explica el 69.61% de la variabilidad en  $I_p$ . El estadístico  $R^2$  ajustado, el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables, es 39.21%.

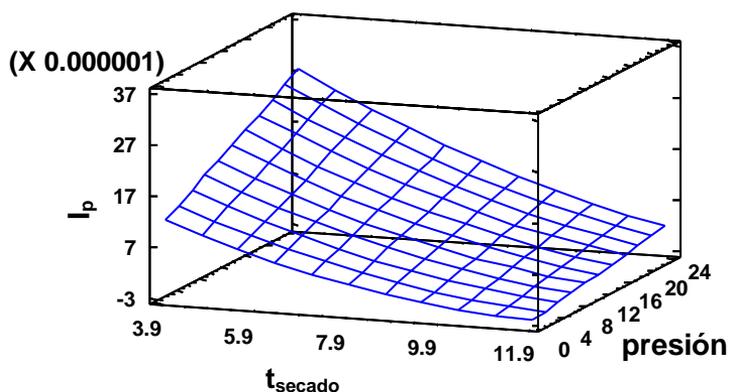
**Tabla 11. Efectos estimados para  $I_p$ .**

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	8.30E-06	3.68E-06	
A:tsecado	-1.34E-05	4.51E-06	1.0
B:presión	6.83E-06	4.51E-06	1.0
AA	2.15E-06	5.36E-06	1.095
AB	-2.16E-06	6.37E-06	1.0
BB	9.19E-8	5.36E-06	1.095

Se puede observar en la Tabla 11 que el V.I.F. es igual a 1.095 para dos efectos, por lo que el diseño no es perfectamente ortogonal.

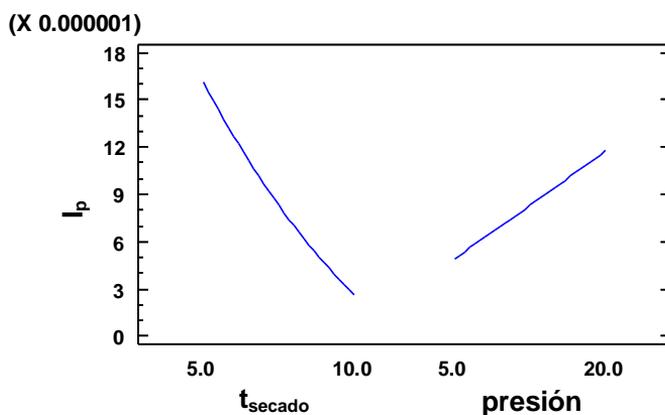
La Figura 25 muestra la superficie de respuesta estimada, mostrando que no hay un tiempo de secado ni presión en la que se

obtenga una mejor respuesta. Sin embargo, sí que se aprecia una tendencia hacia tiempos bajos y presiones altas.



**Figura 25. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 26 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos. Y como se aprecia en la Figura 26, se ve que existe una proporcionalidad directa entre la presión y la intensidad de pico ( $I_p$ ), esta última es inversamente proporcional con respecto al tiempo de secado.



**Figura 26. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

Según el análisis realizado por el propio software, éste propone unas condiciones óptimas para el diseño de experimentos a un volumen de 400  $\mu\text{L}$  de CNFs de cada factor experimental:

$$t_{\text{sec}} = 3.96 \text{ s y } P = 23.11 \text{ tons}$$

Las pruebas realizadas para un volumen de 200 y 400  $\mu\text{L}$  de CNFs 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  aportan resultados contradictorios. Los valores óptimos para ambos diseños arrojan valores diferentes. Para la presión se obtiene un valor de 12 tons para 200  $\mu\text{L}$  y 23 tons para 400  $\mu\text{L}$ , que supone una incoherencia. Esto se puede observar también para el tiempo de secado. Esta discrepancia en los resultados para ambos factores nos llevan a la conclusión de que secar el filtro para posteriormente pegarle sobre una lámina de PET es la mejor opción.

### **1.2. Pruebas con otros disolventes para CNFs**

La elección de disolvente para llevar a cabo la dispersión de CNFs es muy importante. Hasta ahora, el medio más utilizado para dispersar nanotubos era agua con surfactantes. En el grupo de Análisis Instrumental se ha implementado un método para sustituir los surfactantes por disolventes orgánicos con muy buenos resultados. También se van a emplear estos disolventes para dispersar nanofibras de carbono.

#### **1.2.1.1,2-Dicloroetano (DCE)**

El procedimiento a seguir es el implementado en el grupo para dispersar nanotubos de carbono [288]. Se prepara una disolución de 0.5 mg/100 mL de nanofibras de carbono en DCE. La dispersión se lleva a cabo:

- La disolución con 15 mL se dispersa durante 15 min a una amplitud del 50% con una sonda de ultrasonidos (CY-500, Optic ivymen System).
- La disolución con 100 mL se dispersa:
  - 20 min a una amplitud del 25% con una sonda de ultrasonidos.
  - 20 min a una amplitud del 50% con una sonda de ultrasonidos.

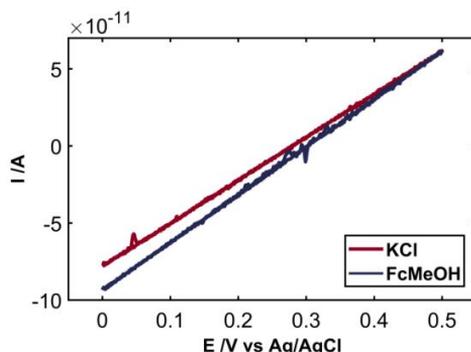
La cantidad de disolución filtrada es de 4 mL. Siendo el tiempo de secado del filtro inferior a 5 min para una mejor transferencia y una presión de la prensa sobre la lámina de PET de 15 a 20 tons durante 60 s.

Se prepara una disolución de CNFs siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Se procede a preparar unos electrodos con las características de la Tabla 12.

**Tabla 12. Condiciones de los electrodos de CNFs dispersadas en DCE.**

Nº	V <sub>CNFs/DCE</sub> , mL	t <sub>sec</sub> , S	Presión y tiempo	
			P, tons	t <sub>presión</sub> , S
1	1	270	20	90
2	2	300	20	90
3	1	145	20	90
4	4	210	20	90

El electrodo cuya transferencia a la lámina de PET es mejor es el n°4. Es por ello, que se deciden preparar más electrodos con las mismas condiciones. El análisis de los mismos con un sistema de referencia como es el ferrocenometanol, muestra que el DCE no es un buen disolvente para dispersar CNFs.



**Figura 27. Señal electroquímica de ferrocenometanol 1 mM/ 0.1 M KCl con un electrodo de CNFs dispersadas en DCE.**

A la vista de la nula señal de los electrodos se decide probar con otro disolvente orgánico.

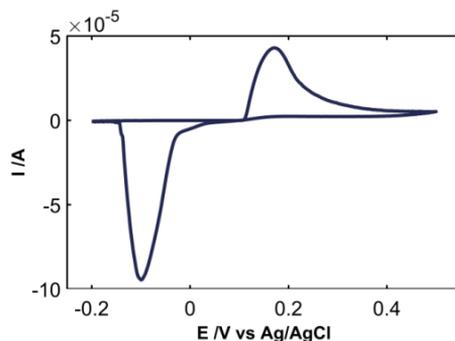
### 1.2.2. Cloroformo

Otro disolvente empleado para dispersar CNTs es el cloroformo. Debido a sus buenos resultados se empleará para dispersar CNFs. En un primer acercamiento se preparan electrodos con una gran variabilidad en cuanto al volumen filtrado y tiempo de secado, manteniendo constante la presión en la prensa (20 tons) y el tiempo de prensado (2 min):

$V_{\text{CNFs}}$ : 3, 4, 5 y 6 mL

$t_{\text{sec}}$ : 0, 5 y 30 min

La señal obtenida para los electrodos se ve en la Figura 28.



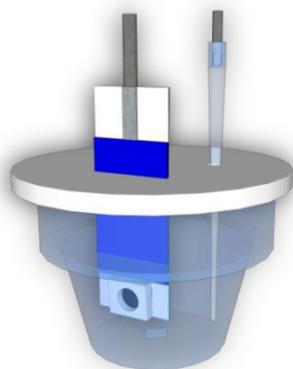
**Figura 28. Señal electroquímica del ferrocenometanol para electrodos de CNFs dispersados en cloroformo.**

A la vista de que las señales obtenidas son parecidas a pesar de la gran variabilidad en el volumen de nanofibras de carbono y el tiempo de secado del filtro se decide repetirlo llevando a cabo una especie de diseño de experimentos, Tabla 13, para comprobar principalmente la influencia en la señal del volumen de CNFs filtradas.

**Tabla 13. Características de los electrodos de CNFs empleando como disolvente cloroformo.**

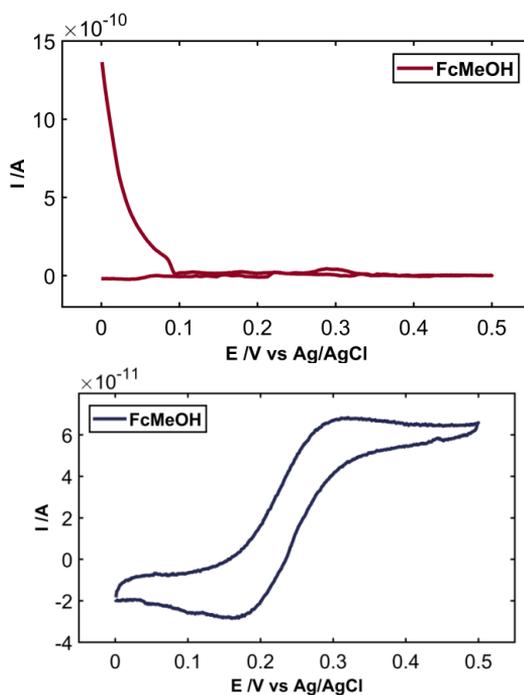
Nº	$V_{\text{CNFs/CHCl}_3}$ , $\mu\text{l}$	$t_{\text{sec}}$ , min	Presión y tiempo	
			P, tons	$t_{\text{presión}}$ , S
1	200	0	20	150
2	200	5	20	150
3	200	30	20	150
4	300	0	20	150
5	300	5	20	150
6	300	30	20	150
7	400	0	20	150
8	400	5	20	150
9	400	30	20	150
10	500	0	20	150
11	500	5	20	150
12	500	30	20	150
13	600	0	20	150
14	600	5	20	150
15	600	30	20	150

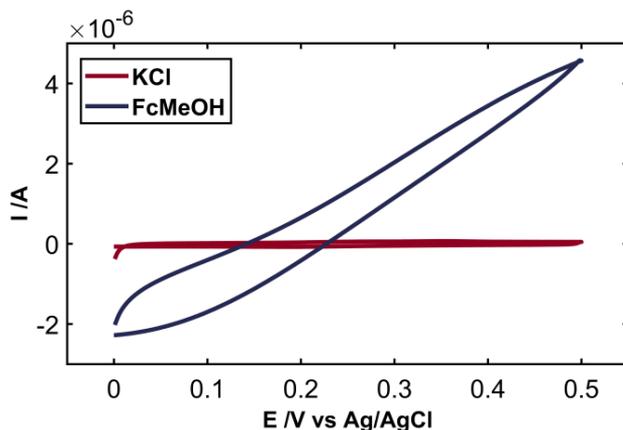
Se eligen tres electrodos en función del volumen: el de 200, 400 y 600  $\mu\text{L}$  de CNFs a 5 min de secado y se comprueba si conducen utilizando FcMeOH. Para ello se utilizará una celda convencional como la de la Figura 29.



**Figura 29. Celda electroquímica clásica.**

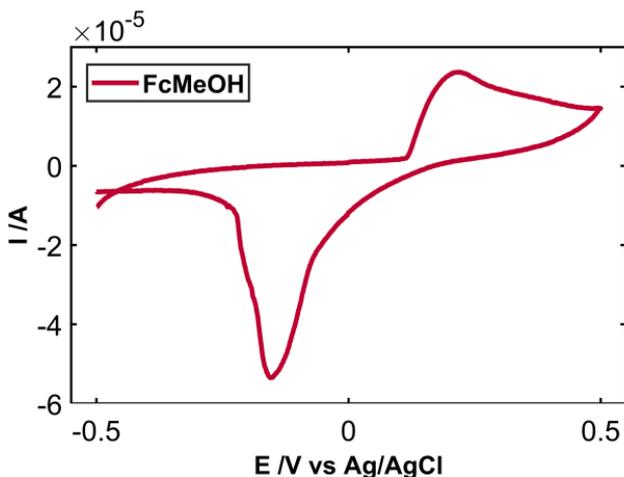
Como se puede observar el electrodo cuyo volumen de CNFs filtrado es 400  $\mu\text{L}$  muestra una mejor señal electroquímica del ferrocenometanol. Para un volumen de 200  $\mu\text{L}$  hay señal pero es pésima, debido a que el volumen sea insuficiente para que las distintas nanofibras estén interconectadas las unas con las otras. Para un volumen de 600  $\mu\text{L}$ , el electrodo es conductor.





**Figura 30. Respuesta electroquímica para electrodos con un volumen de CNFs se 200  $\mu$ L, 400  $\mu$ L y 600  $\mu$ L.**

Los electrodos descritos en la Tabla 13 se van a comprobar su funcionamiento con el sistema de referencia empleado anteriormente. De todos los electrodos el número 6 es el único que posee una señal electroquímica. El resto no son conductores.



**Figura 31. Señal electroquímica del electrodo n°6 de la Tabla 13 para el sistema de referencia ferrocenometanol.**

### 1.2.3. Etanol

A la vista de los resultados obtenidos con diferentes disolventes orgánicos, el disolvente escogido en las primeras pruebas (etanol)

es el que proporciona mejores señales electroquímicas (apartado 1.1. Primeros pasos). Además las dispersiones de este disolvente son más sencillas y menos tóxicas, por ello será el medio escogido para dispersar nanofibras de carbono en esta tesis.

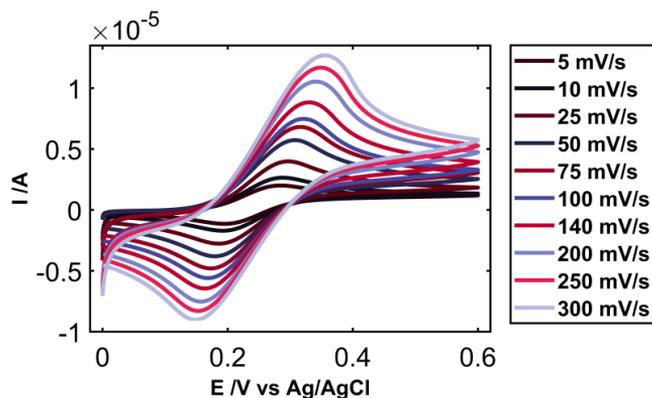
Se decide incrementar la cantidad de nanofibras de carbono. Una pequeña prueba filtrando 1 mL de CNFs/Etanol  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  y transfiriendo posteriormente a una lámina de PET permite obtener un electrodo con una superficie eléctrica con más volumen y con mejor conexión entre fibras. Por ello se decide preparar más y emplearlos para medir dos sistemas redox reversibles diferentes y probar con ello la viabilidad de los electrodos fabricados con CNFs con el filtro de teflón (PTFE) directamente fijado a la lámina de PET. Los dos sistemas escogidos, son dos sistemas de referencia electroquímicos bien conocidos el ferrocenometanol y la  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ .

### *1.2.3.1. Ferrocenometanol*

#### *1.2.3.1.1. I vs. $v^{1/2}$*

El ferrocenometanol es un sistema en cuya reacción se ve implicada un único electrón. Los voltamperogramas cíclicos para el electrodo CNFs/PTFE se registran a diferentes velocidades de barrido, entre  $0.005$  a  $0.3 \text{ V s}^{-1}$ . en  $0.86 \text{ mM}$  ferrocenometanol (FcMeOH) y  $0.1 \text{ M}$  KCl.

Mediante voltamperometría cíclica entre  $+0 \text{ V}$  y  $+0.6 \text{ V}$  se obtiene la Figura 32.



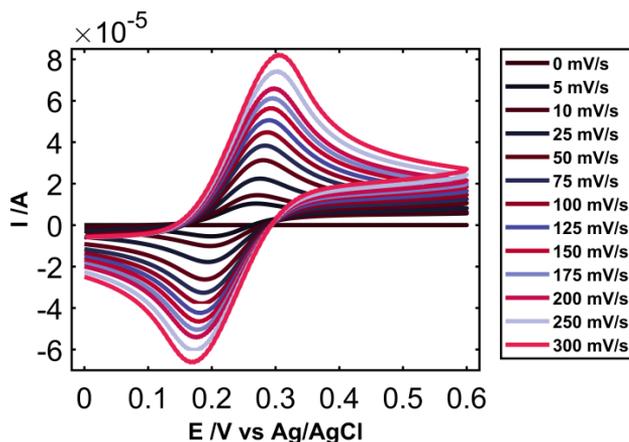
**Figura 32. Voltamperometría cíclica de ferrocenometanol a diferentes velocidades de barrido.**

Viendo que los electrodos de prueba con mayor volumen de CNFs funcionan muy bien y que dan unas señales muy buenas, se decide preparar nuevos electrodos con volúmenes, tiempos de secado, etc. controlados.

**Tabla 14. Características de fabricación de los electrodos de CNFs dispersados en etanol.**

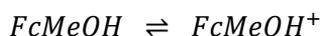
Nº	V <sub>CNFs/EtOH</sub> , µl	t <sub>sec</sub> , h	Presión, tons y min	
1	500	24	18	4
2	500	24	18	4
3	500	24	18	4
4	1000	24	18	4
5	1000	24	18	4
6	1000	24	18	4
7	1000	24	18	4
8	1000	24	18	4

Para el electrodo nº6 de la Tabla 14, el voltamperograma queda como la Figura 33.

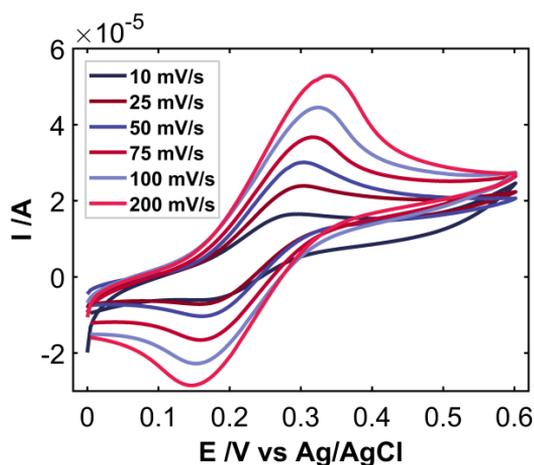


**Figura 33. Voltamperograma para distintas velocidades de barrido.**

Como se puede observar en la Figura 33 el sistema presenta un comportamiento prácticamente reversible, con un pico anódico alrededor de +0.3 V y el pico catódico en torno a +0.17 V, relacionados con la reacción:



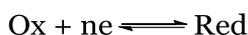
La misma reacción tiene lugar para la experiencia de la Figura 34.



**Figura 34. Voltamperometría cíclica para diferentes velocidades de barrido.**

En los respectivos calibrados existe una buena relación lineal entre la intensidad de pico, tanto para el pico anódico ( $I_p^{an}$ ) como el catódico ( $I_p^{cat}$ ) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ).

Para un proceso reversible, las concentraciones de las distintas especies en la superficie del electrodo cumplen la ley de Nerst. Para un proceso redox la reacción es:



La intensidad de pico,  $I_p$ , presenta un máximo que puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$I_p = -0.4463 \cdot \left(\frac{F^3}{RT}\right)^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_{ox}^{1/2} \cdot C_{ox}^* \cdot v^{1/2}$$

Donde  $F$  es la constante de Faraday (96480 C/mol),  $R$  la constante de los gases ideales (8.32 J/mol K),  $T$  la temperatura (K),  $A$  el área expresada en  $\text{cm}^2$ ,  $D_{ox}$  el coeficiente de difusión de la especie oxidada siendo sus unidades  $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $C_{ox}^*$  la concentración de la especie oxidada en la disolución en  $\text{mol}/\text{cm}^3$ , la velocidad de barrido es  $v$  en  $\text{V s}^{-1}$  y la intensidad de pico  $I_p$  expresada en A. Esta ecuación conocida como ecuación de Randles-Sevcik a 25°C se expresa de la siguiente forma:

$$I_p = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_{ox}^{1/2} \cdot C_{ox}^* \cdot v^{1/2}$$

Las unidades de la constante  $2.69 \cdot 10^5$  son  $\text{C} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{V}^{-1/2}$ . De los calibrados, Figura 34, podemos afirmar que la relación entre  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  indica que la oxidación del FcMeOH es un proceso electroquímico controlado por difusión que sigue la ecuación de Randles-Sevcik.

Las rectas de calibrado para el pico anódico y catódico son:

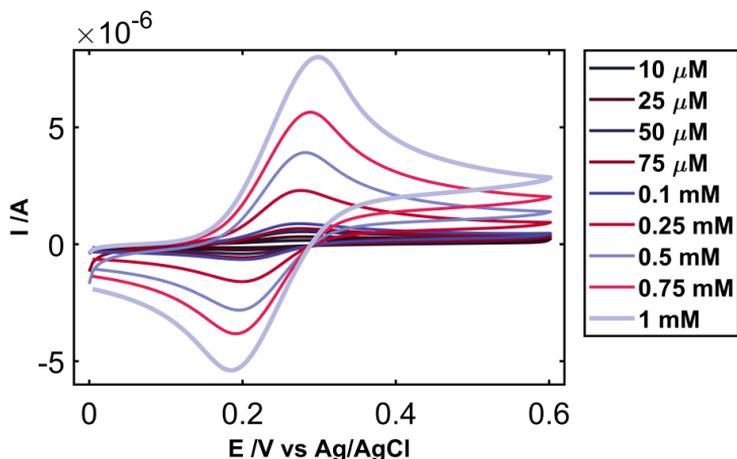
$$I_p^{an} = 8.4 \cdot 10^{-5} \cdot v^{1/2} + 8.6 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.999, S_{yx} = 4.5 \cdot 10^{-7}.$$

$$I_p^{cat} = -5.4 \cdot 10^{-5} \cdot v^{1/2} - 3.5 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.994, S_{yx} = 6.0 \cdot 10^{-7}.$$

El coeficiente de difusión del FcMeOH en la literatura varía entre  $7 \cdot 10^{-6}$  y  $7.8 \cdot 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s. Se toma un valor de  $7.5 \cdot 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s como coeficiente de difusión ( $D_{ox}^{1/2}$ ), una concentración ( $C_{ox}^*$ ) 1 mM de FcMeOH y que solo está implicado un electrón en la reacción redox ( $n = 1$ ). A partir de ello, se puede calcular el área efectiva del electrodo CNFs/PTFE a partir de las regresiones  $I_p^{an}$  vs  $v^{1/2}$ , obteniendo un valor de 0.13 cm<sup>2</sup> [286].

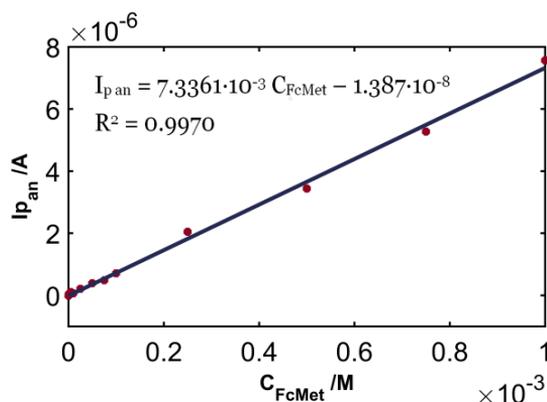
#### 1.2.3.1.2. I vs. C<sub>FcMeOH</sub>

Se lleva a cabo un calibrado con FcMeOH empleando voltamperometría cíclica entre +0 V y +0.6 V para un electrodo de 1 mL de CNFs/PTFE/PET. En este caso, la concentración de la disolución de ferrocenometanol aumenta de 1 μM hasta 1 mM.



**Figura 35. Voltamperogramas para ferrocenometanol desde una concentración 10 μM hasta 1 mM.**

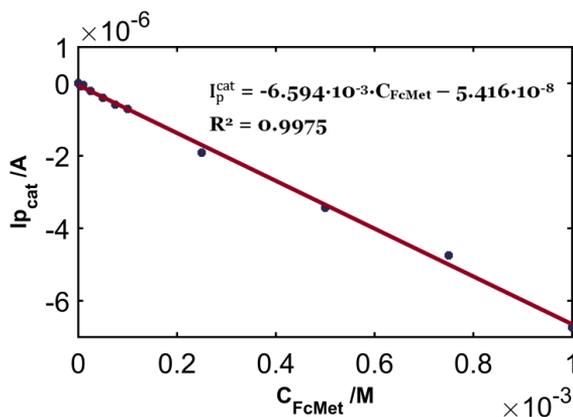
Representando  $I$  vs  $C_{\text{FcMeOH}}$ , tenemos los calibrados anódico y catódico.



**Figura 36. Calibrado Intensidad de pico anódico vs Concentración de ferrocenometanol.**

En la Figura 36 vemos como los datos para pico anódico se ajustan a una recta:

$\Delta I_p^{an}(A) = 7.336 \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{FcMeOH}} \cdot (M) - 1.387 \cdot 10^{-8}$  y el coeficiente de determinación  $R^2 = 0.997$ .



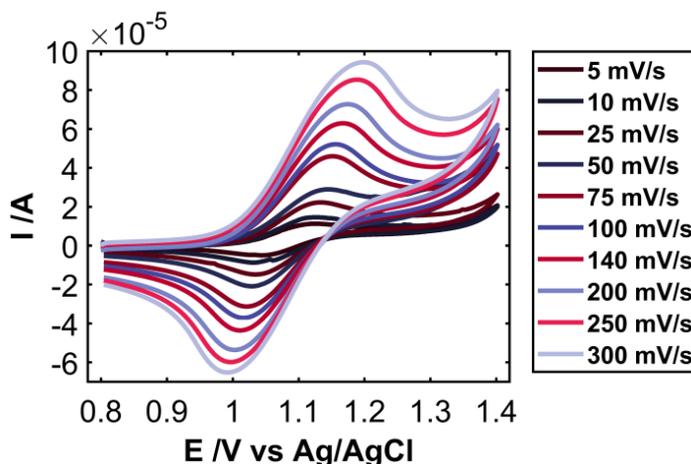
**Figura 37. Calibrado Intensidad de pico catódico vs Concentración de ferrocenometanol.**

En la Figura 37 vemos como los datos para pico catódico se ajustan a una recta:

$\Delta I_p^{cat}(A) = -6.594 \cdot 10^{-3} \cdot C_{FcMeOH} \cdot (M) - 5.416 \cdot 10^{-8}$  y con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.998$ .

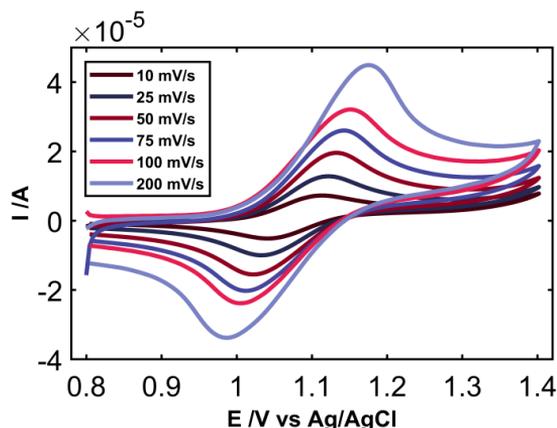
### 1.2.3.2. *Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>*

El segundo sistema de referencia escogido es la  $Ru(bipy)_3^{2+}$ . Al igual que con el FcMeOH, en su reacción de oxidación-reducción también está implicado un único electrón. Se va estudiar por voltamperometría cíclica el electrodo CNFs/PTFE para una concentración 1 mM  $Ru(bipy)_3^{2+}$  y 1 M  $KNO_3$  para diferentes velocidades de barrido, entre 0.01 y 0.2 V s<sup>-1</sup>. A continuación, se puede observar el voltamperograma para dos electrodos de CNFs/PTFE, cuya diferencia radica en el volumen de nanofibras filtrado, 0.5 mL o 1 mL y el tamaño de la chapa delimitadora del área.



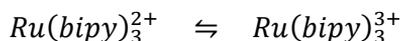
**Figura 38.** Voltamperograma de Rubipy a distintas velocidades de barrido para un electrodo de 0.5 mL CNFs/PTFE y agujero grande.

Si se realiza el mismo análisis para un electrodo de 1 mL de nanofibras de carbono se obtiene la Figura 39.



**Figura 39. Voltamperograma de Rubipy a distintas velocidades de barrido para un electrodo de 1 mL CNFs/PTFE y agujero pequeño.**

La  $Ru(bipy)_3^{2+}$  también presenta un comportamiento reversible, con un pico anódico en torno a +1.15 V y el catódico a +1.0 V. Ambos relacionados con la reacción redox:



La Figura 39 nos permite obtener una relación lineal entre el pico anódico ( $I_p^{an}$ ) y el catódico ( $I_p^{cat}$ ) frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ). Las rectas de calibrado son:

$$I_p^{an} = 7.9 \cdot 10^{-5} \cdot v^{1/2} - 2.3 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.999, S_{yx} = 2.7 \cdot 10^{-7} \text{ e}$$

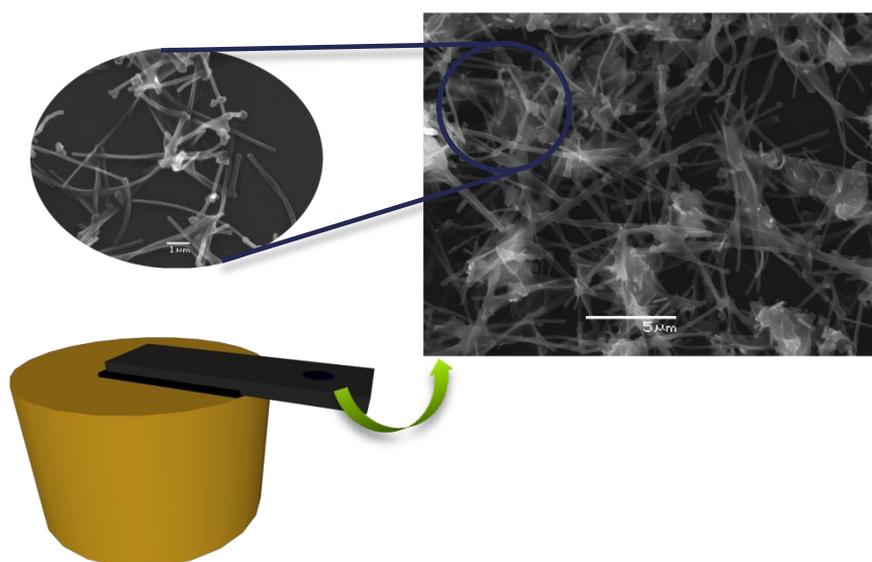
$$I_p^{cat} = -6.7 \cdot 10^{-5} \cdot v^{1/2} + 1.2 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.995, S_{yx} = 6.1 \cdot 10^{-7}.$$

Al igual que ocurre con el FcMeOH la oxidación de la  $Ru(bipy)_3^{2+}$  es un proceso electroquímico controlado por difusión y por tanto puede aplicarse la ecuación de Randles-Sevcik. Con los datos, área del electrodo 0.13 cm<sup>2</sup>, el número de electrones implicados en la reacción  $n = 1$ , y la concentración  $C_{ox}^* = 1 \text{ mM}$ , se calcula el coeficiente de difusión de la  $Ru(bipy)_3^{2+}$ . El coeficiente de difusión estimado para la  $Ru(bipy)_3^{2+}$  es de  $3.3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , que se corresponde con los valores de la literatura [289].

### 1.3. Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la dispersión de CNFs

Para conocer mejor cómo están dispersadas las nanofibras de carbono en etanol se realiza un análisis por microscopio electrónico de barrido (SEM). Esta técnica proporciona información sobre la morfología de muestras sólidas.

Su funcionamiento se basa en barrer la superficie de la muestra, en un área del tamaño que se desee, con un haz de electrones. La señal obtenida puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos.

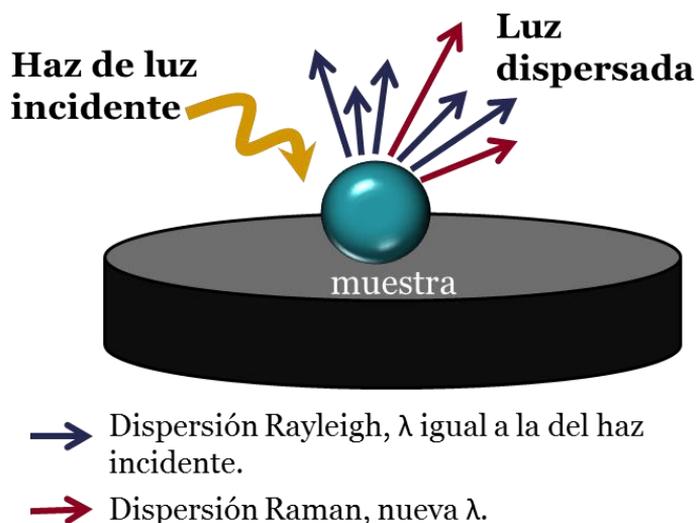


**Figura 40. SEM de la dispersión de CNFs 0.1 mg mL<sup>-1</sup>.**

Por la imagen se puede apreciar que las nanofibras de carbono están bien dispersadas en el disolvente elegido, etanol. Además, se ha calculado el diámetro de las mismas obteniendo un valor de  $154 \pm 14 \text{ nm}$ .

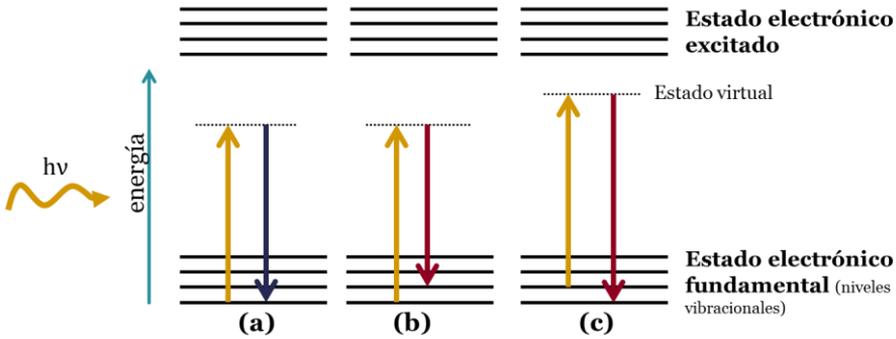
### 1.4. Espectroscopía Raman de CNFs

La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica empleada para estudiar los modos de baja frecuencia, tales como los modos vibratorios, rotatorios, etc. La incidencia de un haz de luz monocromática sobre la muestra proporciona información sobre su estructura molecular, estudiando la dispersión del haz de luz.



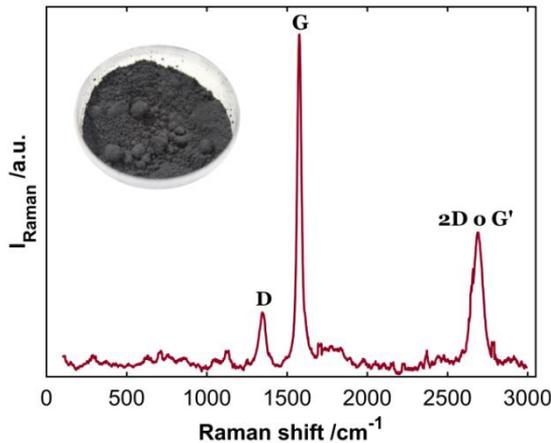
**Figura 41. Principios de la dispersión Raman.**

Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando leves cambios de frecuencia que son propios del material a estudio y además independientes del haz de luz incidente. Cuando el haz de luz incide sobre la muestra interactuando con la nube de electrones de la molécula y provocando la excitación de los electrones a un estado virtual. La relajación del electrón desde el estado virtual a bien un estado vibracional excitado se llama dispersión de Stokes. Y si el electrón se encontraba inicialmente en un estado elevado de energía vibracional se llama dispersión anti-Stokes.



**Figura 42. Diagrama de los niveles de energía para la dispersión Raman; (a) Dispersión Rayleigh, (b) Dispersión Raman Stokes y (c) Dispersión Raman anti-Stokes.**

El espectro Raman está tomado sobre un electrodo de nanofibras de carbono, formando una película, sobre un filtro inerte de teflón<sup>®</sup>.



**Figura 43. Espectro Raman de nanofibras de carbono.**

El espectro Raman muestra tres bandas principales a  $1345\text{ cm}^{-1}$ ,  $1576\text{ cm}^{-1}$  y  $2690\text{ cm}^{-1}$ .

- ✓ A  $1576\text{ cm}^{-1}$  o Banda G, es la más intensa y se atribuye al modo de vibración en el plano del fonón  $E_{2g}$ . El modo  $E_{2g}$  del grafito se corresponde a las vibraciones  $sp^2$  del enlace carbono – carbono.

- ✓ A  $1345\text{ cm}^{-1}$  o Banda D, se corresponde al modo de vibración de respiración en el plano de la simetría inactiva  $A_{1g}$ . El modo  $A_{1g}$  del grafito está relacionado con los defectos estructurales, con la presencia de defectos, sitios vacantes o grupos diferentes como grupos carboxilo. La baja intensidad de esta banda indica la buena organización del material de carbono.

La relación de intensidad de las bandas D/G es inversamente proporcional al orden del grafito en las nanofibras de carbono. El valor  $I_D/I_G$  obtenido del espectro es 0.17 indicando que existe un bajo desorden de los carbono cristalinos de las CNFs.

- ✓ Una tercera banda aparece a  $2690\text{ cm}^{-1}$ , también conocida como Banda 2D. Esta banda se corresponde al armónico de segundo orden de la banda D.

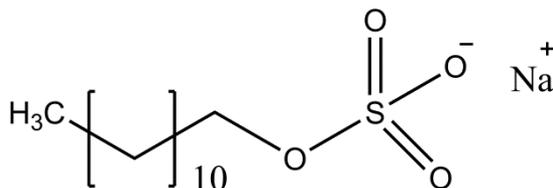
Además de estas tres bandas principales hay otras de baja intensidad y peor definidas en el espectro Raman de la Figura 43. El hombro entorno  $1490 - 1500\text{ cm}^{-1}$  se asigna a los enlaces  $sp^2$  amorfos del carbono. La débil banda comprendida entre los  $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$  podría deberse a la presencia de algún grupo carbonilo (C=O) o enlace simple carbono-oxígeno (C-O).

## 2. Nanotubos de carbono (CNTs)

### 2.1. Pruebas con distintos dispersantes

#### 2.1.1. Dodecilsulfato sódico (SDS)

El dodecilsulfato sódico o SDS es un surfactante empleado para dispersar nanotubos de carbono. Su estructura química es la de la Figura 44.

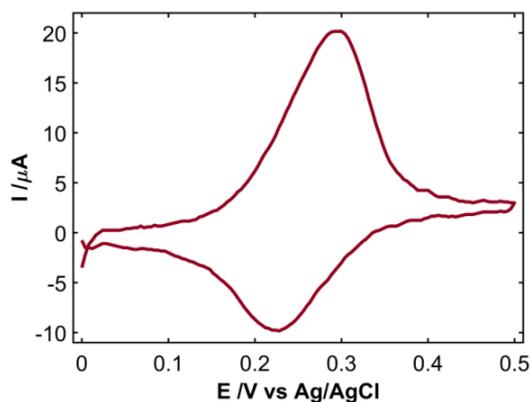


**Figura 44. Estructura química del dodecilsulfato sódico o SDS.**

Las dispersiones resultantes de nanotubos de carbono en SDS al 0.1 % son muy homogéneas.

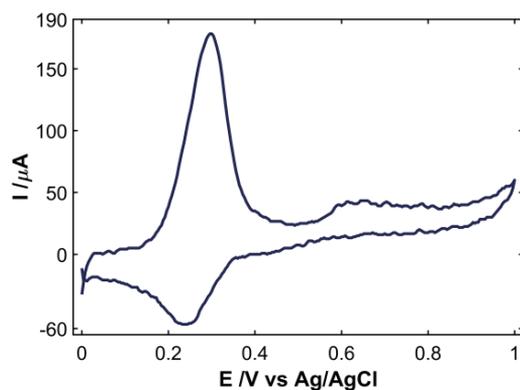
En el mercado existen filtros de varios materiales (teflón, nylon y nitrocelulosa) con distintos tamaños de poro. Sin embargo, el gran problema radica en el alto precio que tienen los filtros de teflón. Por ello, se prueba con filtros tanto de nitrocelulosa como de nylon para encontrar un sustituto viable al teflón. Sin embargo, ni los filtros de nylon ni los de nitrocelulosa a distintos tamaño de poro dan buenos resultados. El único material en el que la dispersión filtra sin ningún tipo de pérdida es el teflón y es el que permite una buena transferencia de los CNTs a la lámina de PET. Los filtros de este material van a ser empleados a partir de ahora para fabricar nuestros electrodos de CNTs.

Estudios previos del grupo nos permite tener una idea de las condiciones experimentales para fabricar electrodos de CNTs. Debido a que la concentración de nuestra dispersión es alta, se toman 250  $\mu\text{L}$  de CNTs para igualar la cantidad de CNTs impregnada con la de estos estudios. El filtro es prensado manualmente sobre una lámina de PET para posteriormente llevar a cabo una voltamperometría cíclica entre +0 V y +0.5 V con ferrocenometanol como sistema de referencia.



**Figura 45.** Voltamperometría cíclica de FcMeOH para un electrodo de CNTs/PET.

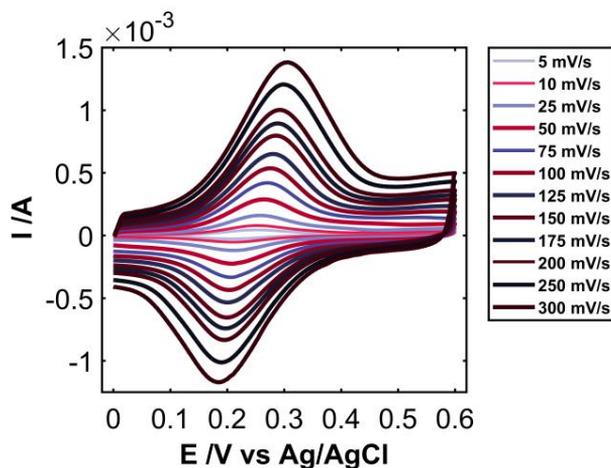
Para un electrodo de 250 μL de CNTs, prensado a 15 tons sobre una lámina de PET.



**Figura 46.** CV de FcMeOH para un electrodo CNTs/PET.

En ambas figuras, tanto para el electrodo prensado a mano (Figura 45) como para el prensado en la prensa (Figura 46) el sistema es reversible. Sin embargo, los picos catódico y anódico no son simétricos. De hecho, el pico catódico es mayor que el anódico lo que indicaría que el fenómeno implicado no es totalmente difusivo, lo que sí ocurre con las CNFs.

Sin embargo aumentando la cantidad de nanotubos de carbono en el filtro hasta 400  $\mu\text{L}$  la señal voltamperométrica del ferrocenometanol es bastante simétrica, demostrando la reversibilidad del sistema.

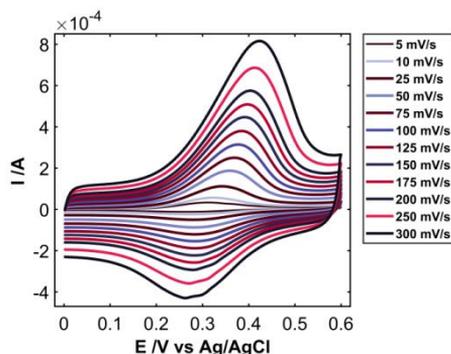


**Figura 47. Voltamperometría cíclica FcMeOH para un electrodo de CNTs/PET.**

Sin embargo, este dispersante plantea algunos problemas de contaminación. Se ha de lavar mucho a la hora de llevar a cabo el filtrado de los nanotubos de carbono no pudiendo eliminar todo el SDS, actuando como interferente. Por ello se plantea el empleo de otros disolventes principalmente orgánicos.

### 2.1.2. Etanol

La elección de este disolvente no es casual, ya que se busca ser capaces de preparar una mezcla de CNFs y CNTs en mezcla. Para ello, la dispersión de CNTs tendrá la misma concentración que la dispersión de CNFs,  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ . El electrodo consiste en 500  $\mu\text{L}$  de CNTs transferidos a una lámina de PET aplicando 20 tons durante 5 min.

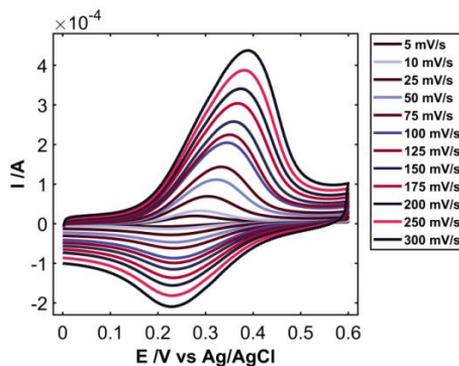


**Figura 48. Voltamperograma de FcMeOH a distintas velocidades de barrido para un electrodo de 0.5 mL CNTs/PET.**

Como se observa en la Figura 48 es sistema es completamente reversible, si bien la altura del pico catódico es mayor que la del pico anódico. Comparándolo con las CNFs, podemos decir que el etanol no es un buen medio en el que dispersar CNTs.

### 2.1.3. Cloroformo

Se decide emplear otro disolvente orgánico no tan tóxico como es el cloroformo. Las condiciones del electrodo son 0.4 mL de CNTs transferidos a la lámina de PET. El análisis de los electrodos con el sistema de referencia ferrocenometanol se realiza por voltamperometría cíclica entre +0 V y +0.6 V a diferentes velocidades de barrido.



**Figura 49. Voltamperograma cíclica de FcMeOH a distintas velocidades de barrido para un electrodo de 0.4 mL CNTs/PET.**

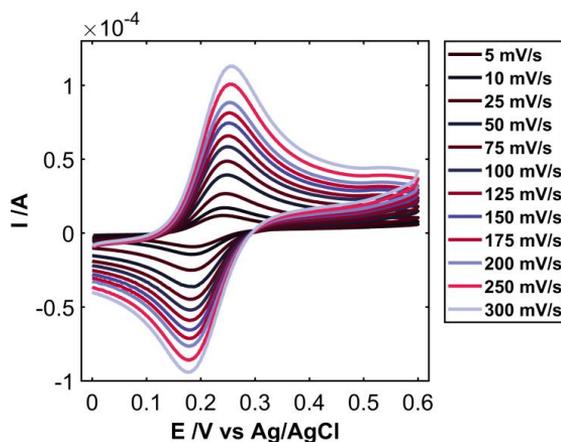
Se obtiene una serie de voltamperogramas similares a los obtenidos para las dispersiones de etanol. Como se observa el sistema no es completamente reversible en parte debido a la resistencia del propio electrodo.

#### 2.1.4. DCE

##### 2.1.4.1. Ferrocenometanol

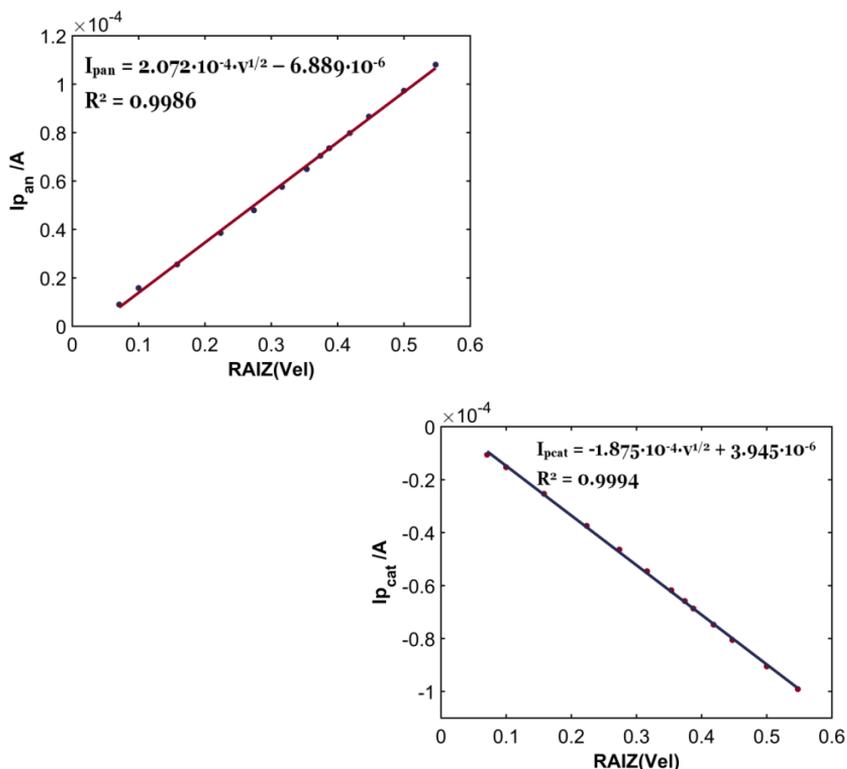
A la vista de que los dispersantes empleados hasta ahora no permiten obtener buenos resultados, se decide realizar unas pruebas empleando el DCE como dispersante viendo la viabilidad a través de otros trabajos realizados en el grupo.

Para ello, se filtran cantidades similares a las utilizadas para las nanofibras de carbono, 0,4 mL de una dispersión de 0.1 mg mL<sup>-1</sup>. Los nanotubos de carbono impregnados en el filtro se transfieren a una lámina de PET, obteniendo un electrodo del tipo CNTs/PET. Las experiencias voltamperométricas recogen en la Figura 50.



**Figura 50. CV de FcMeOH a distintas velocidades de barrido.**

La reversibilidad del sistema nos permite realizar la representación de la  $I$  vs  $v^{1/2}$  para ambos barridos, anódico y catódico.



**Figura 51. Calibrado anódico y catódico del FcMeOH de  $I_{p_{an}}$  e  $I_{p_{cat}}$  vs  $v^{1/2}$ .**

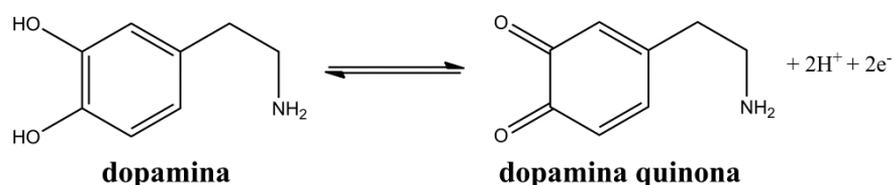
Por la Figura 51 podemos afirmar que la relación entre  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  indica que la oxidación del FcMeOH es un proceso electroquímico controlado difusivamente que sigue la ecuación de Randles-Sevcik. Siguiendo esta ecuación podemos afirmar que existe una buena relación lineal entre la intensidad de pico ( $I_{p_{an}}$  e  $I_{p_{cat}}$ ) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ).

Conocido el coeficiente de difusión del FcMeOH  $7.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  ( $D_{ox}^{1/2}$ ), la concentración ( $C_{ox}^*$ ) 1 mM de FcMeOH y que solo está implicado un electrón en la reacción redox ( $n = 1$ ), se puede calcular el área efectiva del electrodo CNTs/PET a partir de las regresiones  $I_p^{an}$  vs  $v^{1/2}$ , obteniendo un valor de  $0.27 \text{ cm}^2$ .

2.1.4.2. Dopamina

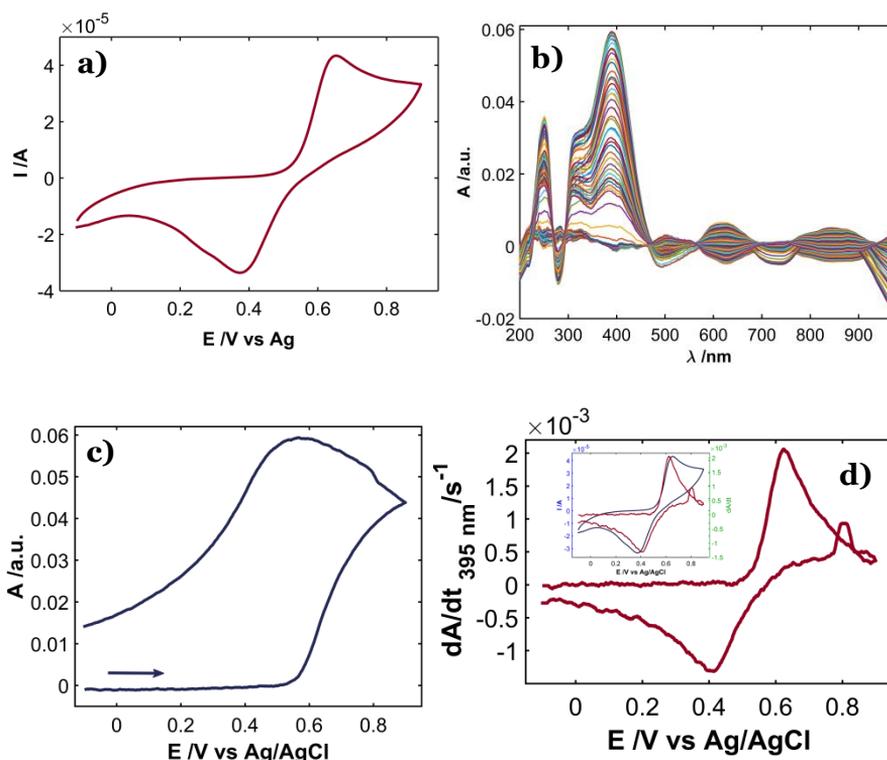
La dopamina es un neurotransmisor presente en el cerebro humano que posee un papel importante en el metabolismo humano, el sistema nervioso central, cardiovascular, renal y hormonal. Su deficiencia está relacionada con desordenes neuronales tales como la esquizofrenia, el Parkinson.... Su concentración en suero sanguíneo y en orina es frecuentemente analizado en el seguimiento de estas enfermedades.

La reacción de oxidación de la dopamina es la siguiente:



**Figura 52. Mecanismo de oxidación de la dopamina.**

Una última evaluación del dispositivo diseñado empleando dispersiones de CNTs en DCE se realizará con este sistema que presenta una banda en torno a 391 nm. Para este propósito se realiza una voltamperometría cíclica colocando la luz cerca de la superficie electródica. El barrido se comienza en sentido anódico observando la oxidación de la dopamina y posteriormente su reducción. La Figura 53 muestra las respuestas electroquímicas obtenidas durante la experiencia voltamperométrica a 0.01 V s<sup>-1</sup> entre -0.1 V y +0.9 V para 1 mM de dopamina en 0.1 M HClO<sub>4</sub>.



**Figura 53.** Señales espectroelectroquímicas obtenidas para Dopamina 1 mM en 0.1 M HClO<sub>4</sub> durante una voltamperometría cíclica. El experimento se lleva a cabo a una velocidad de barrido de 0.01 V s<sup>-1</sup> de -0.1 V a +0.9 V. a) Voltamperograma cíclico, b) Espectro UV-Vis, c) Voltabsorciograma a 395 nm y d) derivada del voltabsorciograma a 395 nm.

La Figura 53a muestra la respuesta electroquímica de la dopamina registrada a lo largo del experimento espectroelectroquímico, donde se aprecia la oxidación a +0.65 V durante el barrido anódico y su correspondiente reducción a +0.37 V en el barrido catódico. La Figura 53b muestra la señal espectral de la dopamina, en el que la banda principal centrada a 395 nm crece a medida que la experiencia evoluciona. El voltabsorciograma a 395 nm, Figura 53c, proporciona información sobre cómo evoluciona la absorbancia durante todo el barrido de potencial. A 395 nm, la absorbancia crece de manera progresiva mientras el potencial se encuentra por

debajo de +0.54 V originando un producto que es reduce fácilmente en el barrido contrario. Durante el barrido catódico la absorbancia a 395 nm decrece cuando el potencial aplicado es inferior a +0.54 V. La Figura 53d muestra la derivada del voltabsorciograma a 395 nm. La derivada es muy similar al voltamperogramas mostrando los mismos resultados que la señal electroquímica.



# *Capítulo 11*



## 1. Electrodos de bismuto

Como se ha comentado anteriormente, los principios de la electroquímica se basaron en los electrodos de mercurio. Sin embargo, su alta toxicidad, motivo por el que ha sido prohibido en numerosos países, propició la búsqueda de nuevos materiales que fueran un digno sustituto de este elemento. En este caso, el bismuto parece cumplir todas las expectativas al tener un comportamiento muy parecido al mercurio al interactuar con los metales pesados.

En este capítulo se abordará diferentes estrategias para modificar nuestros electrodos de diferentes materiales de carbono (nanofibras y nanotubos de carbono) con bismuto.

## 2. Determinación de metales pesados mediante película de bismuto

La determinación de metales pesados comienza con unas primeras pruebas formando una película de bismuto para posteriormente determinar tres metales pesados como son el plomo, el cadmio y el zinc. Como se ha comentado en la introducción hay tres maneras de formar un film de bismuto:

1. Aplicando un potencial constante.

Se deposita a  $-0.4\text{ V}$  (*vs.* SCE) durante 300 s con una disolución  $1\text{ mg mL}^{-1}$  Bi (III) en tampón acetato  $0.1\text{ M}$  a pH 4.45. Se aplica un potencial de  $+0.3\text{ V}$  durante 5 min para reoxidar impurezas, agitando durante la deposición y el acondicionamiento.

Otra opción es aplicar un potencial de  $-1.6\text{ V}$  durante 2 s y posteriormente depositar 300 s a  $-1.2\text{ V}$ .

### 2. Aplicando un barrido de potencial.

Consiste en someter a una disolución 100 mg mL<sup>-1</sup> de Bi (III) en tampón acetato 0.1 M a pH 4.45 entre -1.45 V y -0.3 V (*vs.* SCE) durante 20 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>. Lavar finalmente con agua.

### 3. Deposición galvanostática.

Utilizando una disolución 100 mg mL<sup>-1</sup> de Bi (III) en tampón acetato 0.1 M a pH 4.45. Se aplicará una intensidad de -100 mA cm<sup>-2</sup> durante 300 s.

## **2.1. Electrodeposición de bismuto sobre nanofibras de carbono (CNFs)**

### 2.1.1. Método *ex-situ*

#### *2.1.1.1. Aplicando un potencial constante*

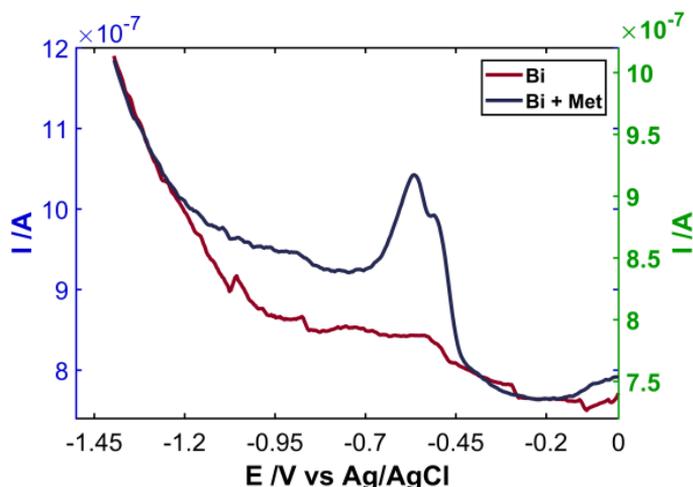
En primer lugar se van a llevar a cabo una serie de pruebas siguiendo el protocolo para el primer método descrito de formación de una película de bismuto: aplicación de un potencial constante.

Para formar la película de bismuto se utiliza una disolución de Bi (III) con una concentración de 2 mg L<sup>-1</sup>. La concentración de la disolución de metales es 10 µg L<sup>-1</sup> de cada metal; plomo, cadmio y zinc, a partir de una disolución stock de 100 mg L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0.1 M pH 4.5.

Las técnicas empleadas para la determinación de Pb (II), Zn (II) y Cd (II) son la voltamperometría diferencial de impulsos de barrido anódico (DPASV) en la que se depositará a un potencial de -1.2 V durante 120 s, seguido de un tiempo de equilibrado de 10 s y un posterior barrido entre -1.4 V y +0 V (amplitud de 80 mV,

incremento de potencial de 5 mV, período de pulso de 0.2 s y anchura de pulso de 1 ms) y la voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SWASV) depositando 120 s a -1.4 V, tiempo de equilibrado de 10 s y un barrido entre -1.4 V y +0 V (incremento de potencial a 4 mV, amplitud 25 mV y frecuencia 25 Hz).

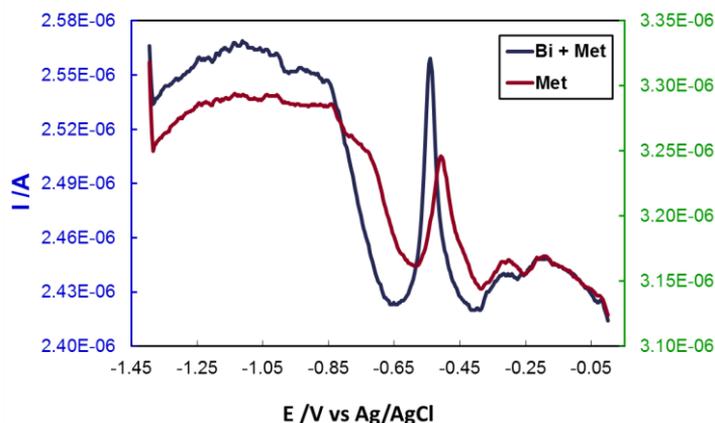
En este caso se han preparado los electrodos con 400  $\mu\text{L}$  de la dispersión de nanofibras de carbono en etanol  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  transferidos a una lámina de PET.



**Figura 54. Representación del barrido tras la deposición de bismuto en presencia y ausencia de una disolución de metales pesados (Zn, Cd y Pb).**

Como se puede ver en la gráfica, el único metal que se aprecia es el plomo (50 nM), sin embargo en la disolución también había cadmio y zinc, que no se aprecian ni empleando SWASV ni DPASV.

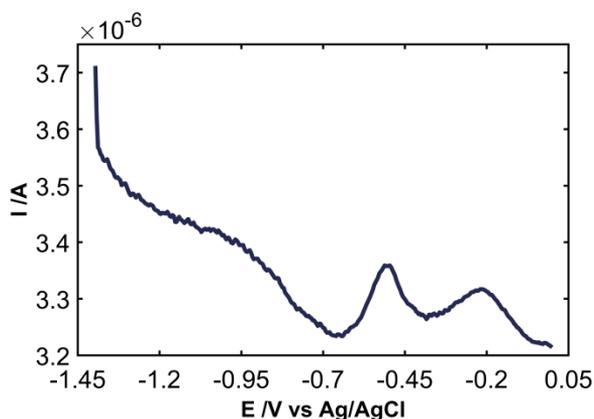
En la Figura 55, se puede ver la experiencia para una disolución de plomo 50 nM sobre el electrodo de CNFs y la señal electroquímica debida al metal tras depositar una película de bismuto a partir de una disolución  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 55. Voltamperometría de redisolución anódica de plomo en presencia y ausencia de la película de bismuto.**

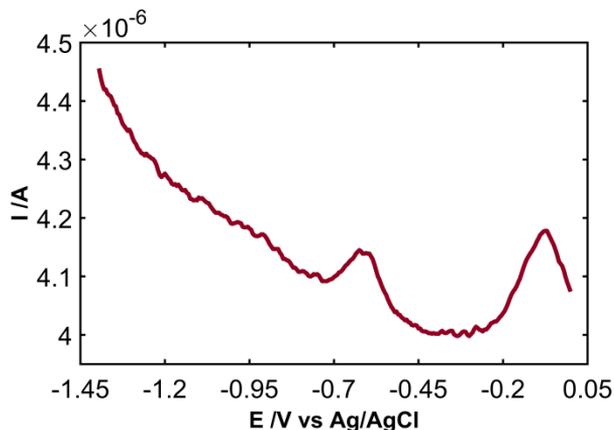
Para comprobar si el volumen de nanofibras influía de alguna manera, se llevaron a cabo las mismas experiencias pero para un volumen filtrado de 200  $\mu\text{L}$  de CNFs  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  y el posterior fijado del filtro a una lámina de PET.

Las experiencias realizadas previamente a la deposición de la película de bismuto sobre la superficie electródica mostraron un pico correspondiente al plomo, a pesar de emplearse una disolución  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ .



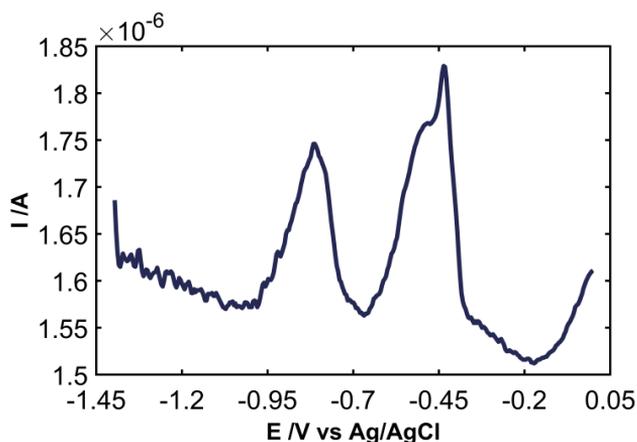
**Figura 56. Señal electroquímica de plomo empleando un electrodo de nanofibras de carbono.**

La deposición de bismuto y su posterior redisolución se puede observar en la Figura 57. La concentración de la disolución de bismuto empleada es  $2 \text{ mg L}^{-1}$  a  $-1.4 \text{ V}$  durante  $300 \text{ s}$ .



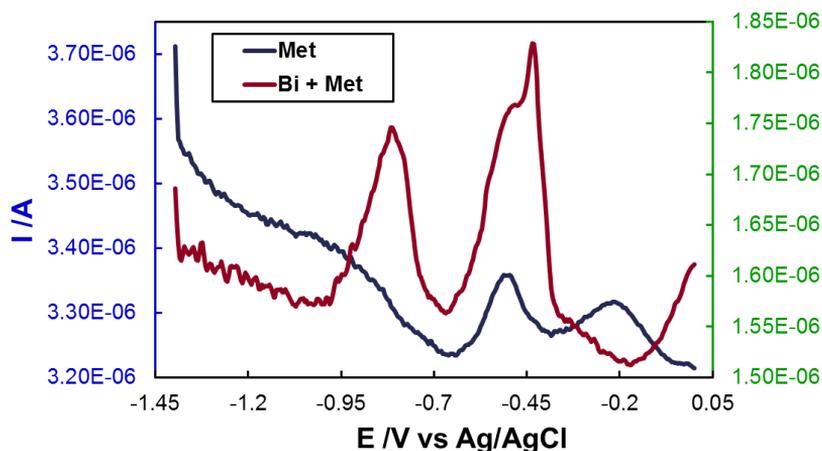
**Figura 57. Redisolución de la película de bismuto sobre un electrodo de CNFs.**

A continuación se mide los metales sobre el electrodo modificado con la película.



**Figura 58. Determinación de metales pesados con un electrodo BiF/CNFs.**

La comparación entre las experiencias efectuadas antes y después de formar la película de bismuto sobre el electrodo, muestra que sin bismuto la señal electroquímica del cadmio no aparece.



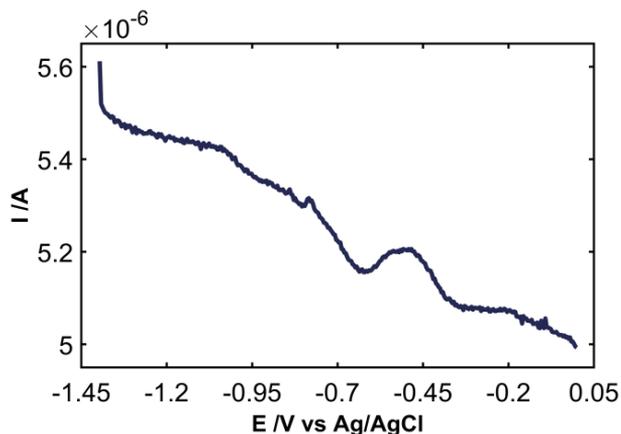
**Figura 59. Comparación de las señales electroquímicas de una disolución que contiene metales pesados antes y después de la formación de una película de bismuto sobre el electrodo de trabajo.**

Lo que sugiere lo que ya se sabe, que el bismuto forma una amalgama con los metales, al igual que lo hace el mercurio, favoreciendo en su redisolución la aparición de la señales electroquímicas que sin la presencia de bismuto no se observarían.

#### *2.1.1.2. Aplicando un potencial constante, opción B*

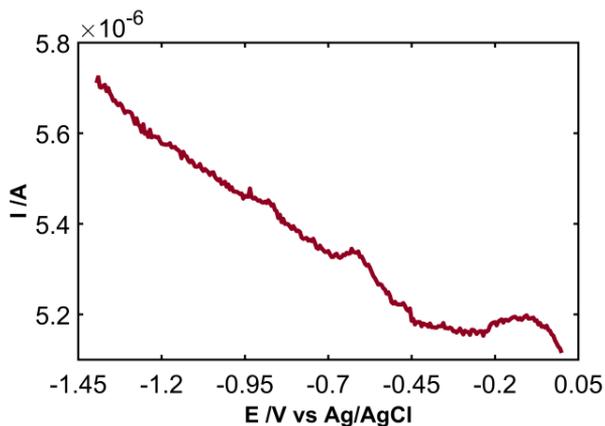
Como se ha comentado anteriormente, existe en la bibliografía una variante del primer proceso descrito para formar la película de bismuto, aplicando un potencial constante. Esta modificación consiste en aplicar un potencial más negativo durante un par de segundos,  $-1.6\text{ V}$  2 s y posteriormente aplicar  $-1.2\text{ V}$  durante 300 s.

Se utilizará un electrodo con un filtro impregnado con  $400\ \mu\text{L}$  de CNFs y posteriormente se ha fijado a una lámina de PET. Como se ha realizado en los otros procedimientos, se mide la disolución de los metales antes de modificar el electrodo con la película de bismuto.



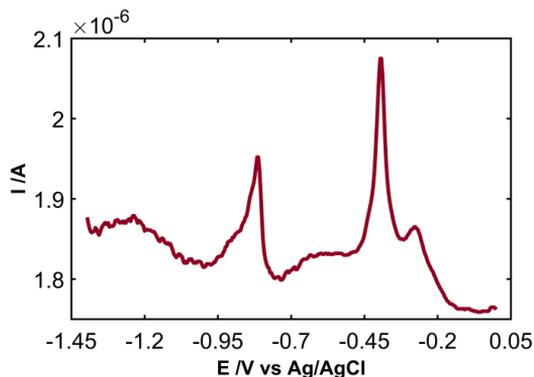
**Figura 60. Voltamperometria de redisolución de metales pesados en ausencia de bismuto.**

Si se deposita la película de bismuto con una disolución  $2 \text{ mg L}^{-1}$  según el procedimiento descrito arriba y se lleva a cabo un barrido, Figura 61, se observa entre  $-0.2 \text{ V}$  y  $+0.05 \text{ V}$  una señal electroquímica correspondiente al bismuto presente sobre la superficie del electrodo.



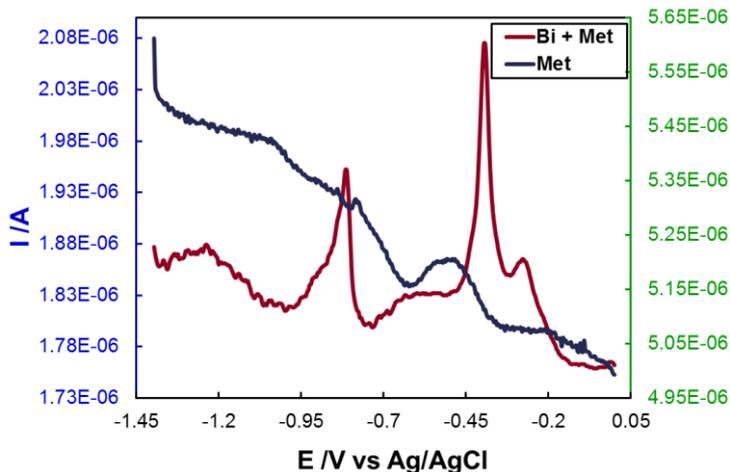
**Figura 61. Redisolución tras la deposición de bismuto.**

Tras volver a modificar la superficie con la película de bismuto, se lleva a cabo una voltamperometría anódica de redisolución de onda cuadrada para una disolución de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ .



**Figura 62. Redisolución de  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  en un electrodo de BiF/CNFs.**

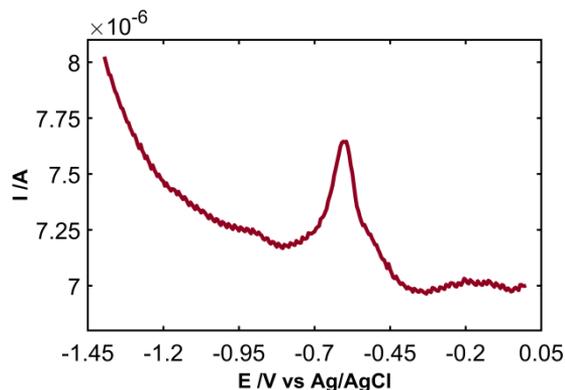
La comparativa entre el antes y el después de la deposición de la película de bismuto se observa en la Figura 63. La presencia de la película de bismuto favorece la amplificación de las señales electroquímicas (línea roja), en el que aparecen a  $-0.43$  V el plomo, a  $-0.83$  V la señal correspondiente al cadmio y a  $-1.22$  V la del zinc.



**Figura 63. Señal electroquímica de redisolución de metales pesados sobre un electrodo de CNFs o BiF/CNFs.**

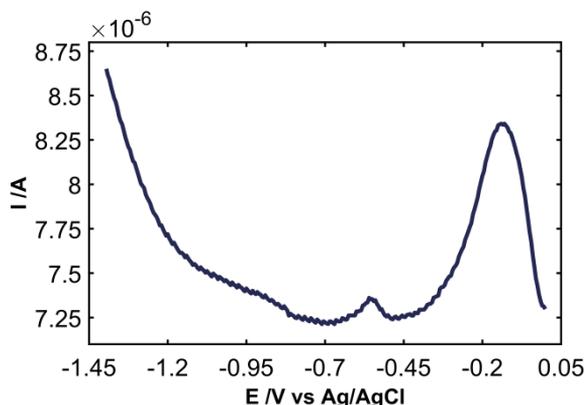
Siguiendo este procedimiento, se empleó también un electrodo con un filtro impregnado con  $200 \mu\text{L}$  de CNFs. La determinación de los metales pesados antes de depositar el bismuto, solo muestra la

señal electroquímica correspondiente al plomo a pesar de que la disolución contiene  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  también, siendo la concentración de todos  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



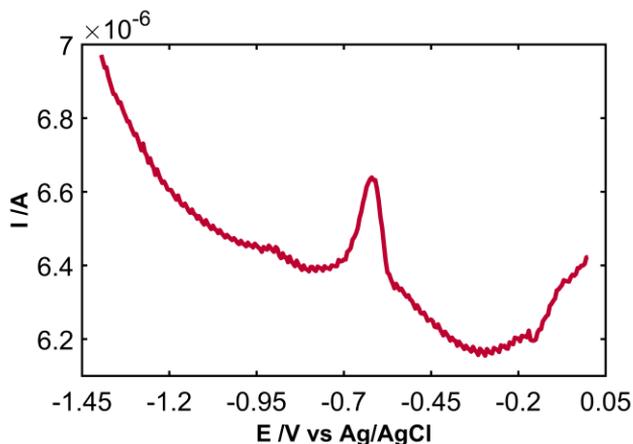
**Figura 64. Señal electroquímica de  $Pb^{2+}$ .**

La deposición de bismuto por este procedimiento (-1.6 V durante 2 s y -1.4 V durante 300 s) y posterior redisolución se puede ver en la Figura 65. Como se puede apreciar, empieza aparecer un pico alrededor de -0.3 V, lo que indicaría la presencia de bismuto.



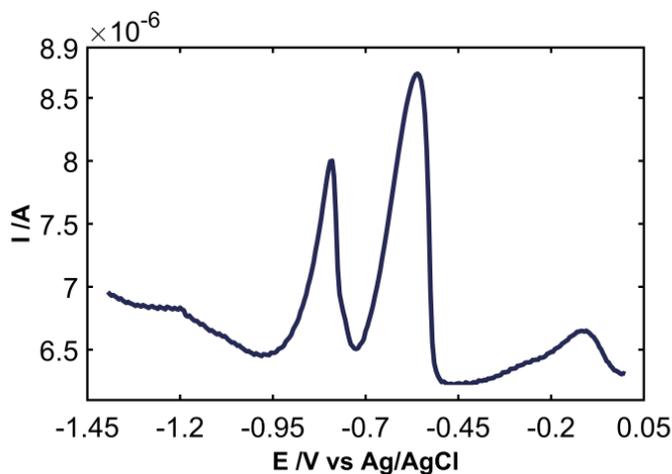
**Figura 65. Redisolución de la película de bismuto sobre un electrodo de CNFs.**

Tras la formación de la película se lleva a cabo la preconcentración de los metales y su posterior redisolución, empleando la disolución  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 66. Señal electroquímica de plomo sobre un BIFE.**

Al emplear una disolución más concentrada de los metales y usar un electrodo BiF/CNFs, las señales electroquímicas de los metales son más grandes, además de aparecer una segunda señal que a bajas concentraciones y sin la película de bismuto no aparece.

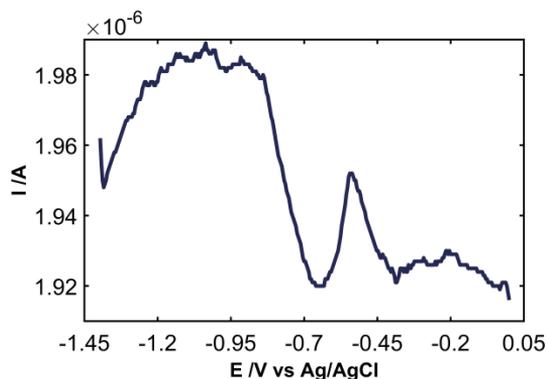


**Figura 67. Redisolución de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  sobre un electrodo modificado con una película de bismuto.**

Lo visto hasta ahora nos permite señalar que la presencia de la película de bismuto permite la detección del cadmio que en ausencia de la misma no sería posible.

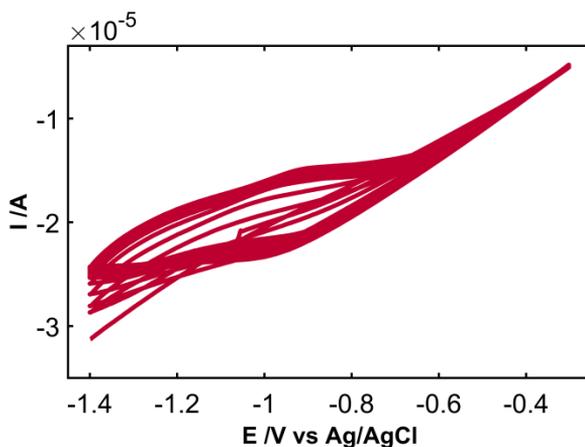
2.1.1.3. *Aplicando un barrido de potencial*

Empleando los electrodos fabricados con los filtros impregnados con 400  $\mu\text{L}$  de CNFs se va a depositar la película de bismuto haciendo ciclos. Previamente a la deposición se hace un análisis de redisolución para la disolución con los metales pesados.



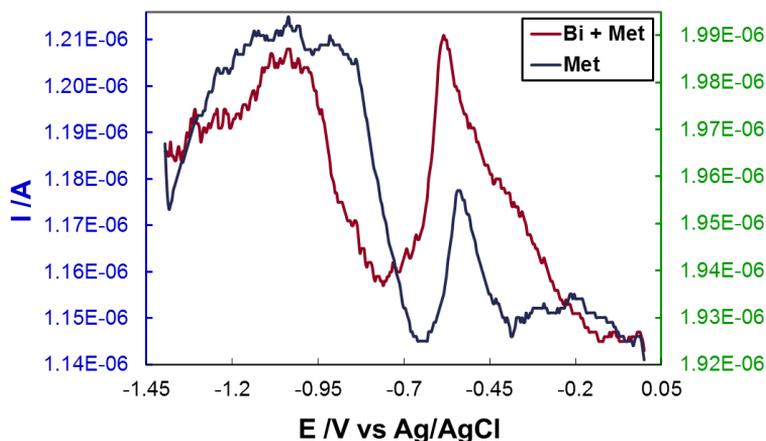
**Figura 68. Voltamperometría de redisolución de metales pesados para electrodos de nanofibras de carbono.**

El bismuto  $2 \text{ mg L}^{-1}$  se deposita haciendo 20 ciclos sucesivos entre  $-1.4 \text{ V}$  y  $-0.3 \text{ V}$  a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . El barrido llega sólo hasta  $-0.3 \text{ V}$  para evitar la redisolución del bismuto depositado sobre el electrodo.



**Figura 69. Deposición de la película de bismuto aplicando barridos sucesivos entre  $-1.4 \text{ V}$  y  $-0.3 \text{ V}$ .**

Tras modificar el electrodo con una película de bismuto se deposita los metales Zn, Cd y Pb empleando una disolución 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La representación conjunta de las experiencias con metales previa y posterior a la deposición de bismuto se puede observar en la Figura 70.



**Figura 70. Representación de las voltamperometrías de redisolución de metales pesados previa y posterior a la deposición de bismuto.**

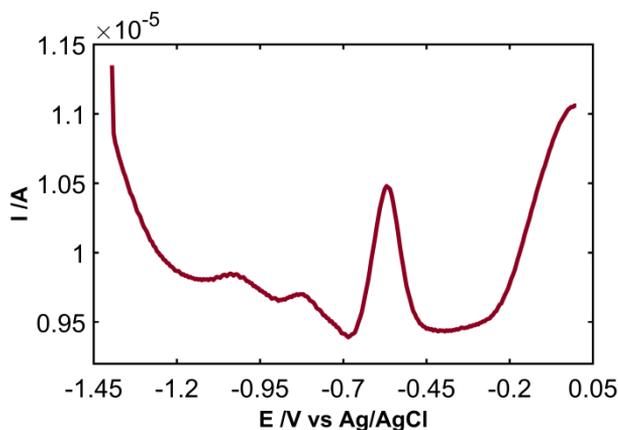
La Figura 70 muestra la señal de los metales cadmio y plomo para un electrodo modificado y sin modificar con una película de bismuto. La señal de color azul se corresponde al electrodo sin modificar, en el que sólo se aprecia una pequeña señal correspondiente al plomo. Sin embargo la presencia de bismuto (línea roja) nos permite observar no solo el pico del plomo sino también el del cadmio.

### 2.1.2. Método in-situ

Para este método se empleará la voltamperometría de onda cuadrada, en la que se depositará el bismuto y los metales durante 300 s a -1.4 V. A continuación, se establece un tiempo de

equilibrado de 10 s y se barre entre -1.4 V y +0 V (frecuencia 50 Hz, incremento de potencial 5 mV y amplitud 50 mV).

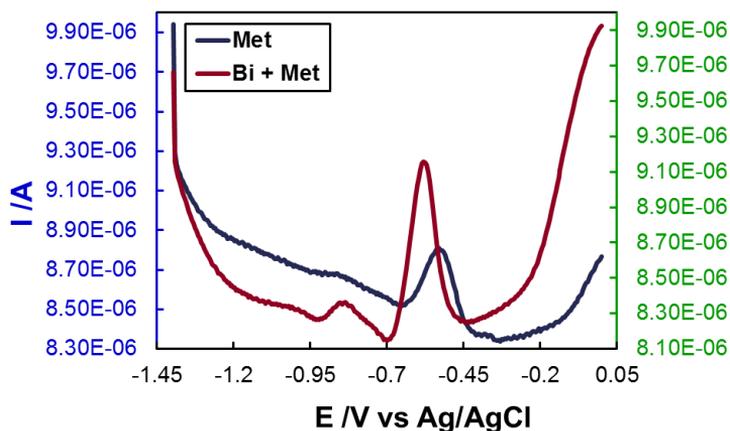
Se empleará un electrodo fabricado con un filtro impregnado con 200  $\mu\text{L}$  de CNFs fijado a una lámina de PET. La disolución empleada contiene 2  $\text{mg L}^{-1}$  de Bi (III) y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Zn (II), Cd (II) y Pb (II).



**Figura 71. Redisolución de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .**

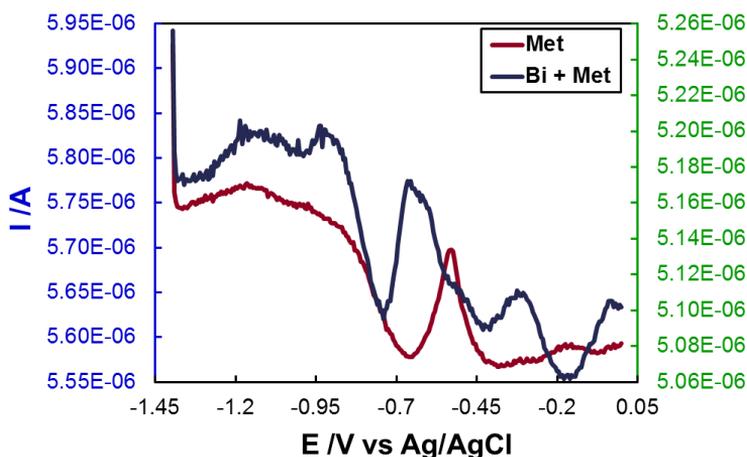
Como se observa en la Figura 71, hay tres picos bien diferenciados y un cuarto que se insinúa. Los picos en torno a -1 V y -0.8 V se corresponderían al  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  respectivamente. El pico a -0.59 V es el del plomo y el que aparece a -0.2 V es el del bismuto. Los resultados son los esperados, puesto que a igual concentración de los metales las señales electroquímicas son menores para  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  que para el  $\text{Pb}^{2+}$ .

Empleando otro electrodo de 200  $\mu\text{L}$  CNFs/PTFE/PET se mide los metales sin bismuto y al depositar bismuto. Se puede apreciar como la señal electroquímica se ve favorecida por la presencia de bismuto, y esta presencia de bismuto permite la detección de  $\text{Cd}^{2+}$  que de otra manera no aparece.



**Figura 72. Comparación de la redisolución de metales pesados antes y después de depositar bismuto para un electrodo 0.2 mL CNFs/PTFE/PET.**

Podemos comparar también si el volumen de nanofibras filtrado es determinante o no para una mayor señal electroquímica de los metales empleando esta técnica. Se va a utilizar un electrodo formado por un filtro impregnado con 400  $\mu\text{L}$  de CNFs.



**Figura 73. Comparación de la redisolución de metales pesados antes y después de depositar bismuto para un electrodo de 400  $\mu\text{L}$  de CNFs.**

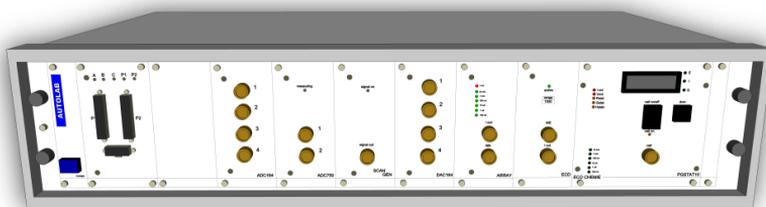
El aumento del volumen de nanofibras de carbono que impregnan el filtro favorecen la aparición de los picos correspondientes a los

tres metales:  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  tras la deposición de la película de bismuto.

### 2.1.3. Análisis de redisolución potenciométrico (PSA)

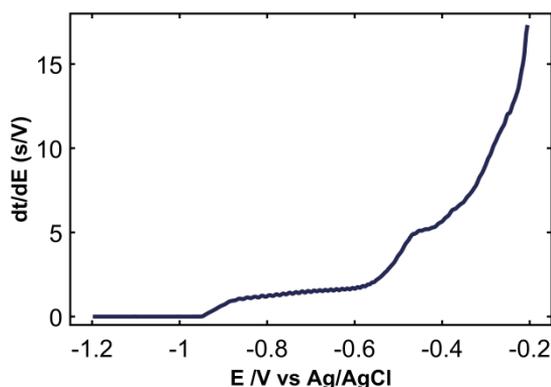
Esta técnica posee numerosas ventajas pero sobre todos son las bajas contribuciones de fondo y el que no existe un efecto matriz.

El equipo utilizado para estas medidas es un Autolab. Los parámetros para esta técnica son deposición seguido de un barrido de redisolución en el que el potencial límite es  $-0.2$  V y el máximo tiempo de medida 25 s.



**Figura 74. Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 20.**

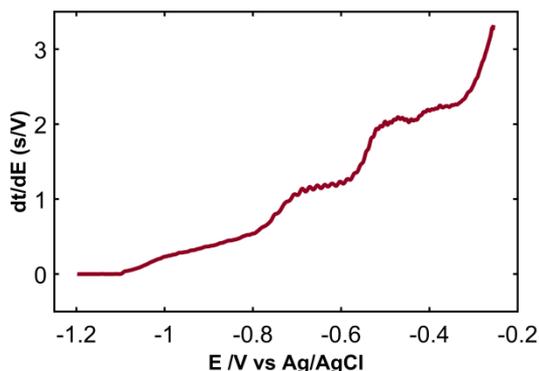
Se van a seguir las concentraciones optimizadas en otra tesis doctoral [290]. Se necesita una disolución de  $1 \cdot 10^{-4}$  M de bismuto y  $1 \cdot 10^{-7}$  M de Pb (II), Cd (II) y Zn (II) en tampón acetato 0.1M a pH 4.45.



**Figura 75. PSA para Bi y Metales depositando 300 s a  $-1.2$  V.**

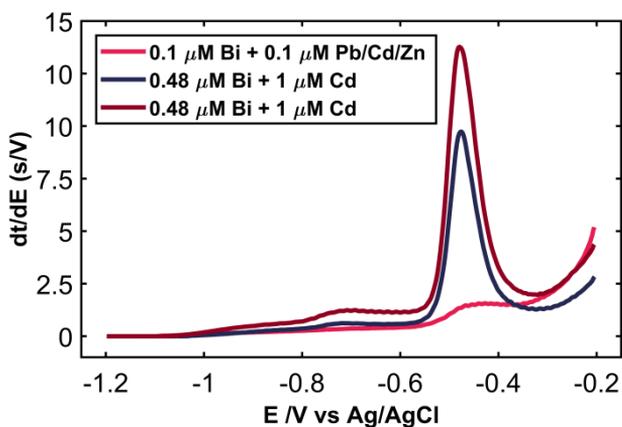
A la vista, de todas las pruebas realizadas el zinc no da señal electroquímica por lo que se decide prescindir de este metal en los sucesivos análisis.

Empleando una disolución nueva  $5 \cdot 10^{-4}$  M Bi (III),  $5 \cdot 10^{-8}$  M Pb (II) y  $5 \cdot 10^{-7}$  M Cd (II) se obtiene unas señales más pronunciadas.



**Figura 76. PSA para  $\text{Bi}^{3+}$  y metales depositando 400 s a -1.2 V, máximo tiempo de medida 1 s y precondicionamiento de 10 s a -0.8 V.**

Si se aplica a varias disoluciones de Bi (III) y metales pesados en distintas concentraciones:  $1 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{Bi}^{3+}$  y  $1 \cdot 10^{-7}$  M  $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ;  $4.8 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{Bi}^{3+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$   $1 \cdot 10^{-6}$  M, depositando 400 s a -1.2 V. Con un potencial límite de -0.2 V y tiempo máximo de medida 3 s.



**Figura 77. PSA  $\text{Bi}^{3+}$  +  $\text{Cd}^{2+}$ .**

En la Figura 77 se ve un aumento de la señal del plomo debido a su acumulación, sin embargo también se puede apreciar un ligero aumento en la señal electroquímica del cadmio, centrada en torno a  $-0.75$  V.

#### 2.1.4. Determinación de metales pesados, otras variables a tener en cuenta

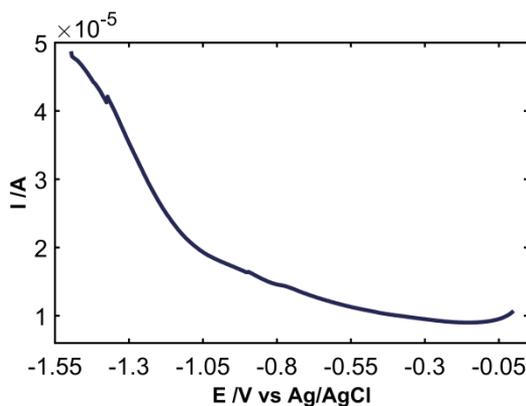
Como se ha comprobado el método in-situ es el mejor procedimiento debido principalmente a su sencillez y al ahorro de tiempo.

Los electrodos empleados serán los que figuran en la Tabla 13. Estos electrodos están fabricados a partir de una dispersión de CNFs en cloroformo. Para ello se empleará una celda tradicional con un sistema de tres electrodos, en el que el referencia es un electrodo no comercial de Ag/AgCl/KCl 3M, el contraelectrodo un hilo de platino y el de trabajo el electrodo de nanofibras de carbono. El equipo utilizado para llevar a cabo estas medidas es un CHI 900 (CH Instruments) y para realizar la deposición simultánea de bismuto y metales pesados se utilizará la técnica de SWASV. Siendo los parámetros:

- $E_i = -1.2$  V y  $E_f = +0$  V
- $E_d = -1.4$  V
- $\text{Incr } E = 0.004$  V
- $t_d = 300$  s
- $\text{Amplitud} = 0.5$  V
- $E_{\text{preacondicionamiento}} = +0$  V
- $\text{Frecuencia} = 25$  Hz
- $t_{\text{preacondicionamiento}} = 60$  s
- $t_{\text{equilibrado}} = 15$  s

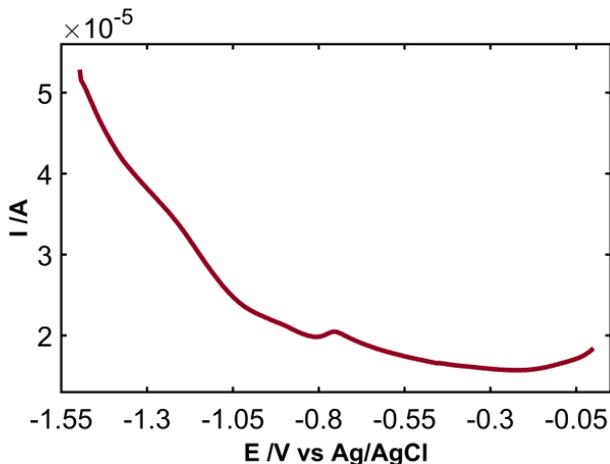
El aumento creciente de la concentración de metales pesados por la adicción de diferentes volúmenes de una disolución de metales pesados,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  arrojan resultados poco satisfactorios. La

concentración de bismuto en la celda es  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ . Para una concentración de  $41.93 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de metales en la celda la señal es nula.



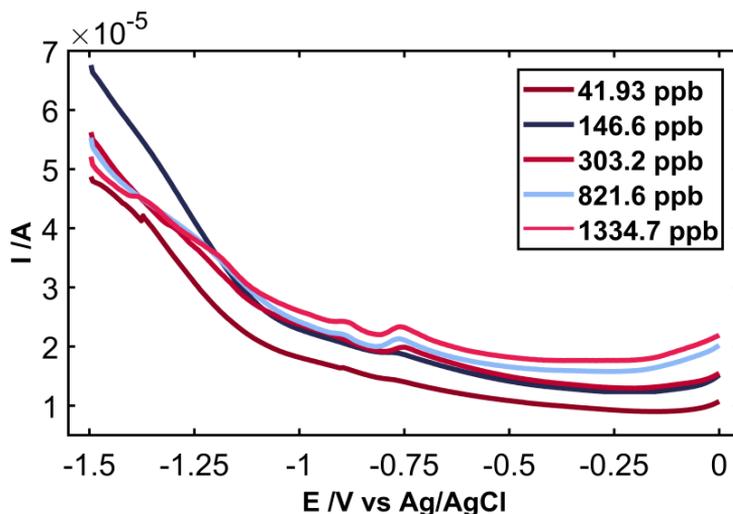
**Figura 78. Señal electroquímica para la deposición simultánea de metales pesados ( $41.93 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y bismuto.**

A una concentración de  $303.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  aparecen una pequeña señal que podría corresponderse a plomo.



**Figura 79. Señal electroquímica para la deposición simultánea de metales pesados ( $303.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y bismuto.**

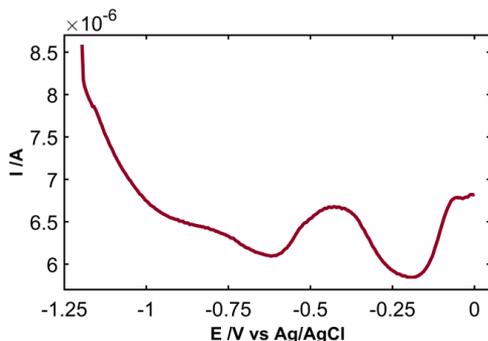
A medida que se añade más cantidad de disolución a la celda, la señal electroquímica aumenta poco a poco.



**Figura 80. SWASV para concentraciones crecientes de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  mediante deposición simultánea.**

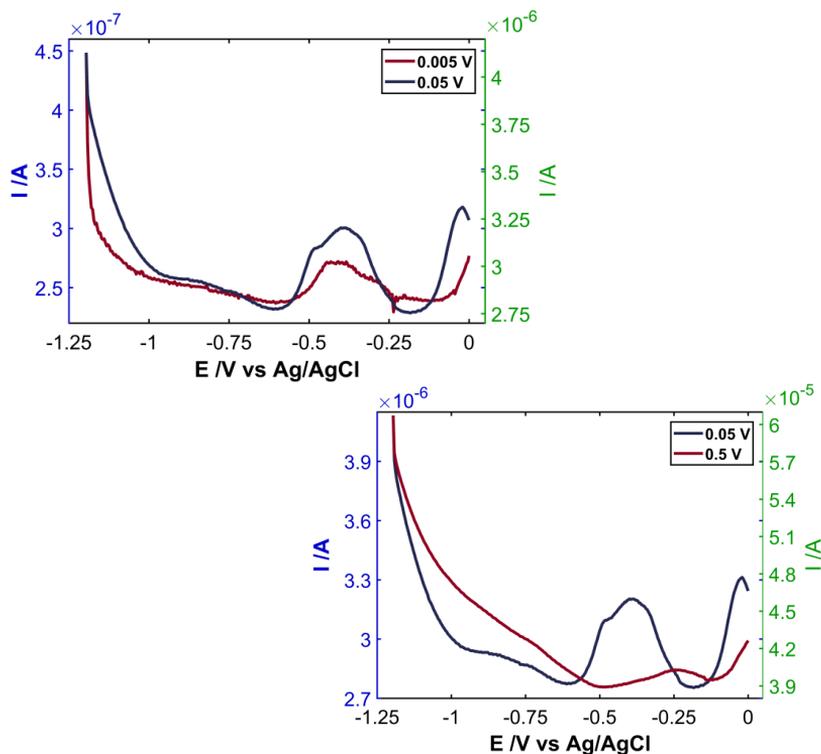
Las señales electroquímicas son realmente bajas cuando la presencia de una película de bismuto debería favorecer el aumento de la señal de los metales pesados debido al comportamiento similar con el mercurio que posee el bismuto. A la vista de estos voltamperogramas nos hacen suponer que la cantidad de bismuto en la disolución no sea suficiente.

Por ello, se van a repetir las experiencias en presencia de una concentración de bismuto en la celda de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Para una concentración de  $48.75 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  sigue sin aparecer señal electroquímica de los metales. Si se aumenta la concentración hasta  $66.91 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y modificamos algún parámetro, concretamente el valor de la amplitud a  $0.05 \text{ V}$  sí hay señal electroquímica de los metales. En torno a  $-0.44 \text{ V}$  se observa la señal electroquímica de redisolución del plomo.



**Figura 81. Respuesta electroquímica para una concentración de metales pesados  $66.91 \mu\text{g L}^{-1}$  a una amplitud de  $0.05 \text{ V}$ .**

Esto indica que la amplitud deberá ser un parámetro a tener en cuenta a la hora de realizar las experiencias. Para una misma concentración de metales,  $91.02 \mu\text{g L}^{-1}$  las señales son muy distintas en función de la amplitud.



**Figura 82. Dependencia de la señal electroquímica con el parámetro amplitud.**

La Figura 82 muestra la gran importancia del parámetro amplitud en la determinación de los metales pesados. Para un valor de 0.5 V no se observa señal de ninguno de los metales cosa que sí ocurre para un valor de 0.05 V y 0.005 V. Para estos dos últimos valores se aprecia la señal del plomo, siendo mejor su señal para un valor de amplitud de 0.05 V.

*2.1.4.1. Diseño de experimentos para 0.27  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  y 0.15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$*

A la vista de que el tiempo de deposición es un parámetro a tener en cuenta así como el valor de amplitud, se decide realizar un diseño de experimentos con el fin de obtener sus valores óptimos. El diseño elegido es un diseño central compuesto estrella  $2^2$  en el que el tiempo de deposición ( $t_d$ ) y la amplitud ( $E_A$ ) serán los factores a optimizar. En total se obtiene un diseño con 11 experiencias (tres réplicas en el punto central) en el que la señal electroquímica de los metales,  $H_p$ , se tomará como variable respuesta del diseño.

Los valores correspondientes al nivel alto (+) y bajo (-) y al punto central de cada factor (0) son los siguientes:

$$\begin{array}{lll} t_d (+) = 300 \text{ s} & t_d (0) = 210 \text{ s} & t_d (-) = 120 \text{ s} \\ E_A (+) = 0.4 \text{ V} & E_A (0) = 0.235 \text{ V} & E_A (-) = 0.07 \text{ V} \end{array}$$

La concentración de los metales pesados empleada para las experiencias del diseño es 0.15  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  y 0.27  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  y 2 mg  $\text{L}^{-1}$  de bismuto en tampón acetato (HAc/NaAc) a pH 4.5. El plomo y cadmio se preconcentran a los valores establecidos para cada experiencia del diseño y llevando a cabo a continuación un barrido de disolución entre -1.2 V y +0 V.

## Capítulo II

Analizando los resultados obtenidos para las diferentes experiencias del diseño se extraen los valores de intensidad de pico tanto para el plomo como para el cadmio. El electrodo empleado está fabricado con 300  $\mu\text{L}$  de CNFs dispersadas en cloroformo, secado el filtro 30 min y prensado a 20 tons durante 150 s.

**Tabla 15. Valores de Intensidad de pico para  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ .**

$t_d$ , s	$E_A$ , V	$H_{p\text{ Pb}}$		$H_{p\text{ Cd}}$	
		E, V	$I_p$ , nA	E, V	$I_p$ , nA
82.7208	0.235	-0.428	43.3	-0.752	88.7
210	0.235	-0.52	17.6	-0.728	52.9
120	0.07	-0.372	31.5	-0.872	103
300	0.07	-0.36	29.7	-0.864	55.5
210	0.235	-0.452	32	-0.664	19.9
337.279	0.235	-0.48	30.9	-0.684	16.3
210	0.46835	-0.408	86.7	-0.808	21.2
300	0.4	-0.352	26.8		0.01
210	0.001655		0.001		0.0056
210	0.235	-0.416	49		0.0146
120	0.4	-0.392	29.9		0.011

Los valores se introducen en el software Statgraphics y se analiza el diseño de experimentos para el plomo. En la Tabla 16, correspondiente al Anova se muestra que no hay ningún efecto que tenga un valor-p menor de 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero a un nivel de confianza del 95%.

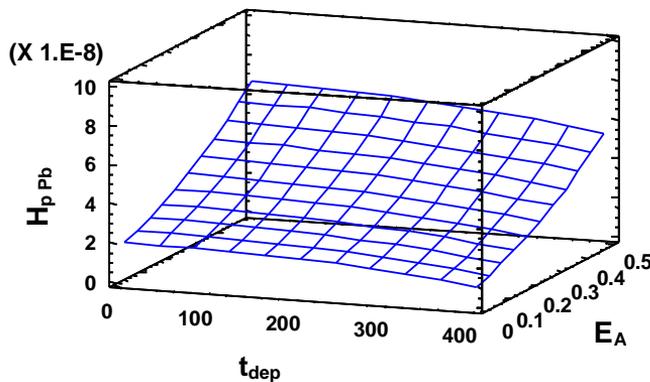
**Tabla 16. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:t <sub>d</sub>	6.29E-17	1	6.29E-17		
B:E <sub>A</sub>	1.74E-15	1	1.74E-15		
AA	1.84E-18	1	1.84E-18		
AB	4.23E-19	1	4.23E-19		
BB	3.69E-17	1	3.69E-17		
Error total	0.0	5	0.0		
Total (corr.)	4.62E-15	10			

R<sup>2</sup> = 100 por ciento

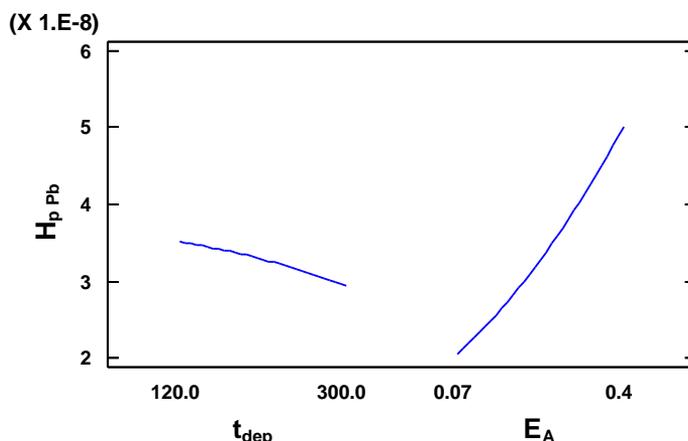
El estadístico R<sup>2</sup> indica que el modelo, así ajustado explica el 100% de la variabilidad en H<sub>p Pb</sub>.

La Figura 83 muestra la superficie de respuesta estimada para el plomo, para la que no hay un tiempo de deposición ni valor de amplitud en el que se obtenga una mejor respuesta, no arroja ningún valor óptimo. Sin embargo sí que presenta una tendencia hacia valores grandes de E<sub>A</sub> y más ligeramente hacia valores pequeños para t<sub>dep</sub>.



**Figura 83. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 84 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de deposición simultánea de  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . Se ve que existe una proporcionalidad directa entre el valor de amplitud y  $H_{p, \text{Pb}}$ , e inversamente proporcional al  $t_{\text{dep}}$ .



**Figura 84. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

El software, tras analizar el diseño proporciona unos valores óptimos para cada factor. Las condiciones óptimas proporcionadas por el software en el proceso de deposición simultánea de metales pesados y bismuto y el parámetro amplitud de la técnica SWASV son:

$$t_d = 82.7208 \text{ s y } E_A = 0.468345 \text{ V}$$

Si se analiza el diseño de experimentos para los valores de intensidad de pico para el cadmio se obtienen los siguientes resultados. Como ocurre para el plomo, no hay ningún efecto que tenga un valor-p menor de 0.05 para el análisis de cadmio, indicando que son significativamente diferentes de cero a un nivel de confianza del 95%, Tabla 17.

**Tabla 17. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

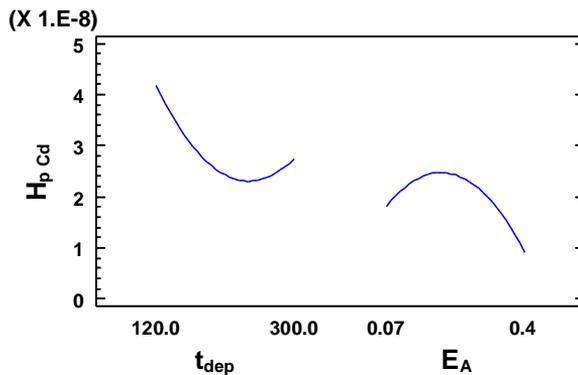
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:t <sub>d</sub>	4.09E-16	1	4.09E-16		
B:E <sub>A</sub>	1.60E-16	1	1.60E-16		
AA	6.04E-16	1	6.04E-16		
AB	5.11E-16	1	5.11E-16		
BB	6.36E-16	1	6.36E-16		
Error total	0.0	5	0.0		
Total (corr.)	8.59E-15	10			

R<sup>2</sup> = 100 por ciento

R<sup>2</sup> (ajustada por g.l.) = 100 por ciento

El estadístico R<sup>2</sup> indica que el modelo, así ajustado explica el 100% de la variabilidad en H<sub>p Cd</sub>. El estadístico R<sup>2</sup> ajustado, el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables, es 100%.

La Figura 85 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de deposición simultánea de Bi<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>.



**Figura 85. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

Como se aprecia en la figura ambos efectos no son lineales. El tiempo de deposición influye en la determinación de cadmio, encontrando una mejor respuesta a  $t_{\text{dep}}$  bajos. Para la amplitud presenta un máximo centrado a 0.235 V a partir del cual hay un cambio en el comportamiento de la variable respuesta.

Las condiciones óptimas proporcionadas por el software para el factor tiempo de deposición y el parámetro amplitud de la técnica SWASV son:

$$t_d = 82.7208 \text{ s y } E_A = 0.324483 \text{ V}$$

Se obtiene mejor respuesta para un tiempo de electrodeposición en ambos metales,  $t_d$ , de 82.7208 s. El valor del parámetro amplitud es relativamente alto lo que contradice los resultados experimentales que se había observado. En los que la señal electroquímica era mejor cuando la amplitud era inferior.

### *2.1.4.2. Diseño de experimentos para 0.43 $\mu\text{M}$ de $\text{Cd}^{2+}$ y 0.24 $\mu\text{M}$ de $\text{Pb}^{2+}$*

Se lleva a cabo un segundo diseño de experimentos para una concentración de metales 0.24  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  y 0.43  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Los factores a analizar son los mismos que para el anterior diseño, así como las condiciones experimentales y el electrodo empleado.

De los resultados obtenidos para las diferentes experiencias del diseño se extraen los valores de intensidad de pico tanto para el plomo como para el cadmio.

**Tabla 18. Valores de Intensidad de pico de Pb y Cd para el diseño de experimentos.**

t <sub>d</sub> , s	A, V	H <sub>p</sub> Pb		H <sub>p</sub> Cd	
		E, V	I <sub>p</sub> , nA	E, V	I <sub>p</sub> , nA
82.7208	0.235	-0.496	86.2	-0.721	20.1
210	0.235	-0.512	62.7	-0.668	22.2
120	0.07	-0.368	36.1	-0.872	288
300	0.07	-0.36	44.0	-0.872	50.4
210	0.235	-0.48	79.7		0.01
337.279	0.235	-0.424	88.8		0.012
210	0.46835	-0.388	25.5	-0.672	12.2
300	0.4	-0.332	18.1	-0.692	21.7
210	0.001655		0.001		0.0011
210	0.235	-0.46	66.3		0.0126
120	0.4	-0.348	12.1	-0.696	15.4

Los valores se introducen en el software Statgraphics y se analiza el diseño de experimentos para el plomo. La tabla del Anova (Tabla 19) muestra que no hay ningún efecto con un valor-p inferior a 0.05.

**Tabla 19. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

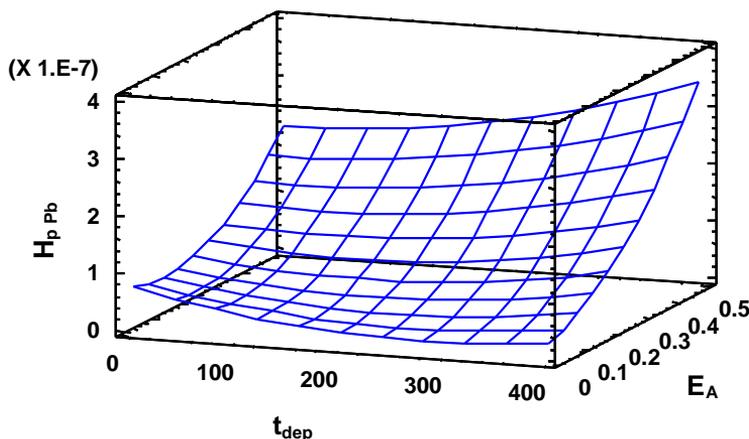
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:t <sub>d</sub>	6.40E-16	1	6.40E-16		
B:E <sub>A</sub>	4.24E-14	1	4.24E-14		
AA	2.02E-16	1	2.02E-16		
AB	6.79E-16	1	6.79E-16		
BB	3.81E-15	1	3.81E-15		
Error total	0.0	5	0.0		
Total (corr.)	5.09E-14	10			

$R^2 = 100$  por ciento

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 100 por ciento

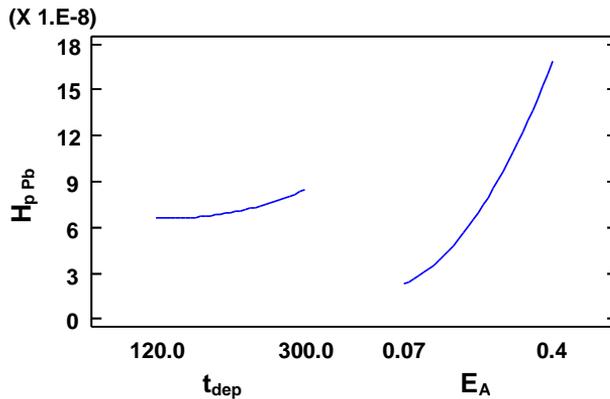
El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado explica el 100% de la variabilidad en  $H_{p\text{ Pb}}$ . El estadístico  $R^2$  ajustado, el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables, es 100%.

La Figura 86 muestra la superficie de respuesta estimada para el plomo. En la figura se puede ver una tendencia a tiempos de deposición y valores de amplitud altos.



**Figura 86. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 87 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de deposición simultánea de  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . El valor de amplitud ( $E_A$ ) es directamente proporcional al valor de intensidad de pico ( $H_{p\text{ Pb}}$ ), y en menor medida también lo es para el factor tiempo de deposición ( $t_{\text{dep}}$ ).



**Figura 87. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

Las condiciones óptimas proporcionadas por el software en el para el tiempo de deposición y el parámetro amplitud de la técnica SWASV son:

$$t_d = 337.279 \text{ s y } E_A = 0.468345 \text{ V}$$

El análisis del diseño para el cadmio con el software Statgraphics, nos permite obtener un Anova, Tabla 20, en la que el p-valor de los efectos es mayor de 0.05 lo que indica que son significativamente diferentes de cero a un nivel de confianza del 95%.

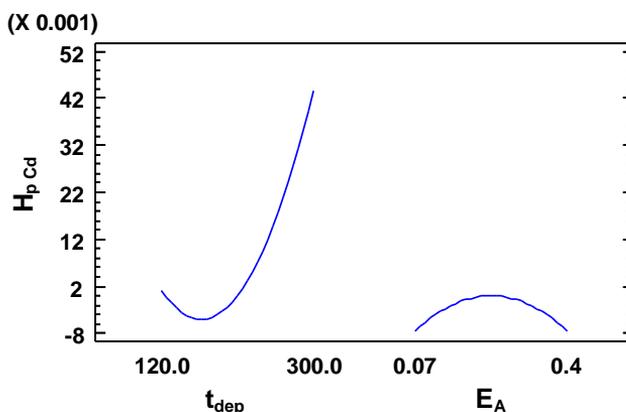
**Tabla 20. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:t <sub>d</sub>	3.60E-03	1	3.60E-03	3.33	0.128
B:E <sub>A</sub>	1.02E-15	1	1.02E-15	0.00	1.000
AA	2.86E-03	1	2.86E-03	2.65	0.165
AB	5.81E-17	1	5.81E-17	0.00	1.000
BB	3.18E-04	1	3.18E-04	0.29	0.611
Error total	5.40E-03	5	1.08E-03		
Total (corr.)	1.31E-02	10			

$R^2 = 58.75$  porciento

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 17.50 porciento

La Figura 88 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de deposición simultánea de  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . El factor amplitud presenta un máximo indicando que el valor óptimo se corresponde con un valor intermedio de amplitud (0.235 V). El aumento de  $t_{\text{dep}}$  provoca una ligera disminución de la señal alcanzando un mínimo en torno a 165 s a partir del cual se produce un cambio en el comportamiento de la variable respuesta. Esta aumenta significativamente a medida que aumenta el tiempo de deposición.



**Figura 88. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

Las condiciones óptimas dadas por el software para  $t_d$  y  $E_A$  son:

$$t_d = 337.279 \text{ s y } E_A = 0.235 \text{ V}$$

Las condiciones óptimas para ambos diseños (a dos concentraciones de metales diferentes) arrojan resultados totalmente contradictorios para el factor tiempo de electrodeposición. Como se observa los valores se corresponden con los valores de los extremos del diseño. El  $t_d$  es un parámetro

influyente para todos los metales y se obtiene mejor respuesta para valores elevados de este factor.

## 2.2. Electrodeposición de bismuto sobre nanofibras de carbono (CNTs)

### 2.2.1. Determinación de metales con CNTs en diferentes dispersantes

#### 2.2.1.1. SDS como dispersante

Para preparar los electrodos de nanotubos de carbono en SDS al 0.1% se va a emplear una dispersión 0.1 mg mL<sup>-1</sup>. A partir de esta dispersión se filtran las cantidades reflejadas en la Tabla 21 utilizando un filtro de teflón.

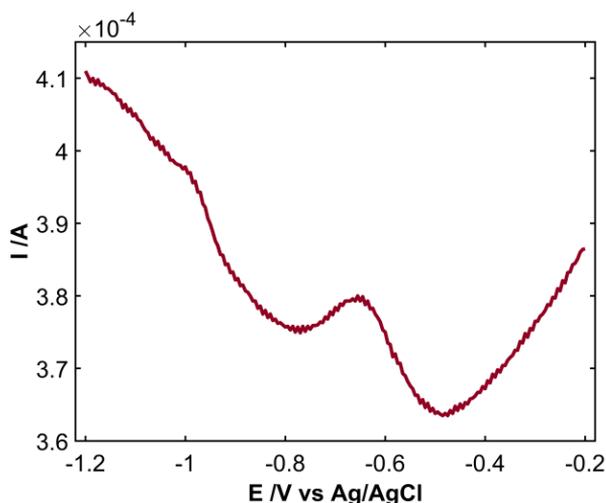
**Tabla 21. Características de los electrodos de CNTs dispersados en SDS.**

Nº	V <sub>CNTs/SDS</sub> , µL	t <sub>sec</sub>	Prensado
1	250	Hasta que se pone opaco el filtro	18 tons 5 min
2	250		18 tons 5 min
3	250		18 tons 5 min

Las medidas electroquímicas se llevan a cabo en una celda convencional, siendo la concentración de bismuto en celda de 2 mg L<sup>-1</sup>. Las condiciones experimentales son:

- ✓ E<sub>con</sub>: +0.3 V
- ✓ t<sub>equil</sub>: 10 s
- ✓ V<sub>barrido</sub>: 0.02 V/s
- ✓ t<sub>cond</sub>: 60 s
- ✓ E<sub>step</sub>: 0.005 V
- ✓ E<sub>i</sub>: -1.2 V
- ✓ E<sub>dep</sub>: -1.4 V
- ✓ E<sub>pulso</sub>: 0.235 V
- ✓ E<sub>r</sub>: -0.2 V
- ✓ t<sub>dep</sub>: 300 s
- ✓ t<sub>pulso</sub>: 40 ms

siendo la técnica escogida la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV).



**Figura 89. Señal electroquímica de 0.603  $\text{pg L}^{-1}$  para un electrodo de CNTs/PET.**

La sensibilidad del electrodo de CNTs transferidos es muy alta teniendo en cuenta que es capaz de detectar una concentración de 0.603  $\text{pg L}^{-1}$  de Pb.

### *2.2.1.2. DCE como dispersante*

La determinación de plomo empleando un electrodo de 0.4 mL de CNTs/PET se lleva a cabo por voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) en una celda convencional simultáneamente a la disposición de bismuto. La concentración de plomo en celda varía entre 0.125 y 1.25  $\text{ng L}^{-1}$  y la de bismuto 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . El tampón empleado para estas experiencias es el tampón acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ ) a pH 4.5. Ambos metales se depositan a -1.2 V durante 200 s previo pretratamiento a -1 V durante 10 s y barriendo entre -0.9 V y -0.2 / +0 V.

La Figura 90 muestra las experiencias a diferentes concentraciones de plomo llevadas a cabo por voltamperometría diferencial de pulsos incluyendo la señal electroquímica correspondiente al tampón acetato en ausencia del metal.

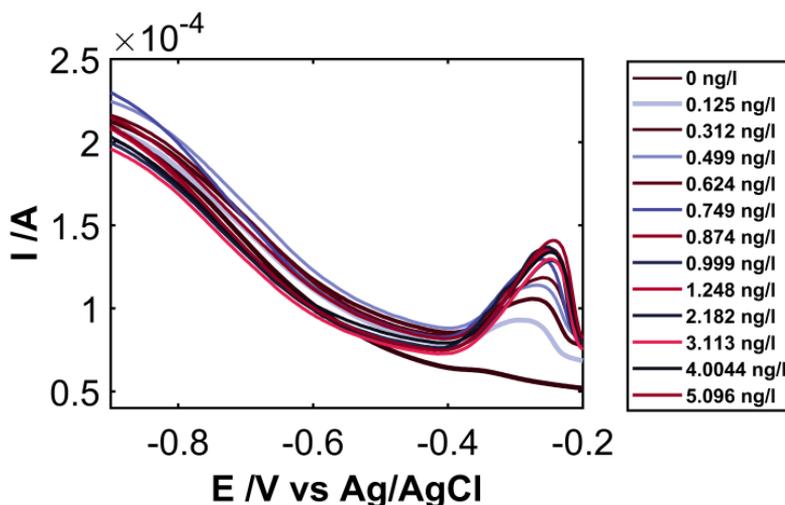


Figura 90. Voltamperometría diferencial de pulsos para un electrodo CNTs/PET entre 0.125 y 1.25 ng L<sup>-1</sup> de Pb (II) y 1 µg L<sup>-1</sup> de Bi(III).

El pico de oxidación centrado en torno a -0.28 V se atribuye al proceso de oxidación del bismuto metálico en la superficie del electrodo tras la deposición  $Bi^0 \rightleftharpoons Bi^{3+}$ .

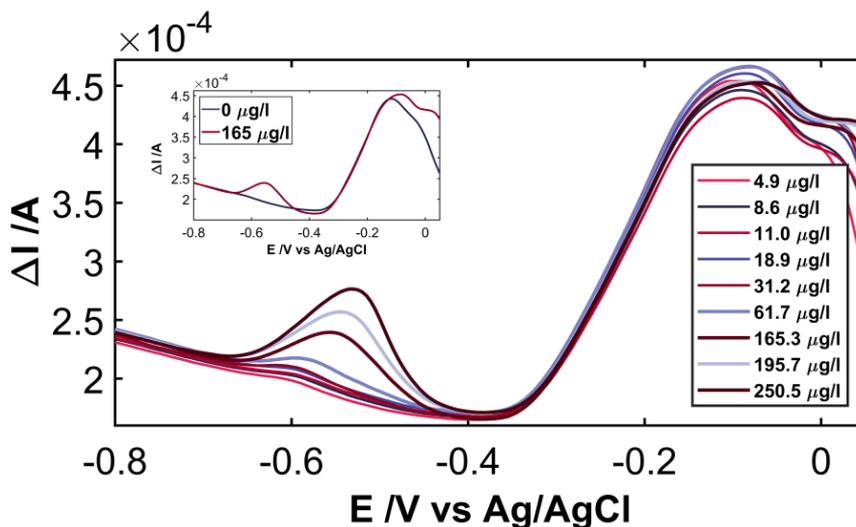


Figura 91. Voltamperometría diferencial de pulsos para un electrodo CNTs/PET entre 2.5 y 250.5 µg L<sup>-1</sup> de Pb (II) y 20.9 mg L<sup>-1</sup> de Bi(III).

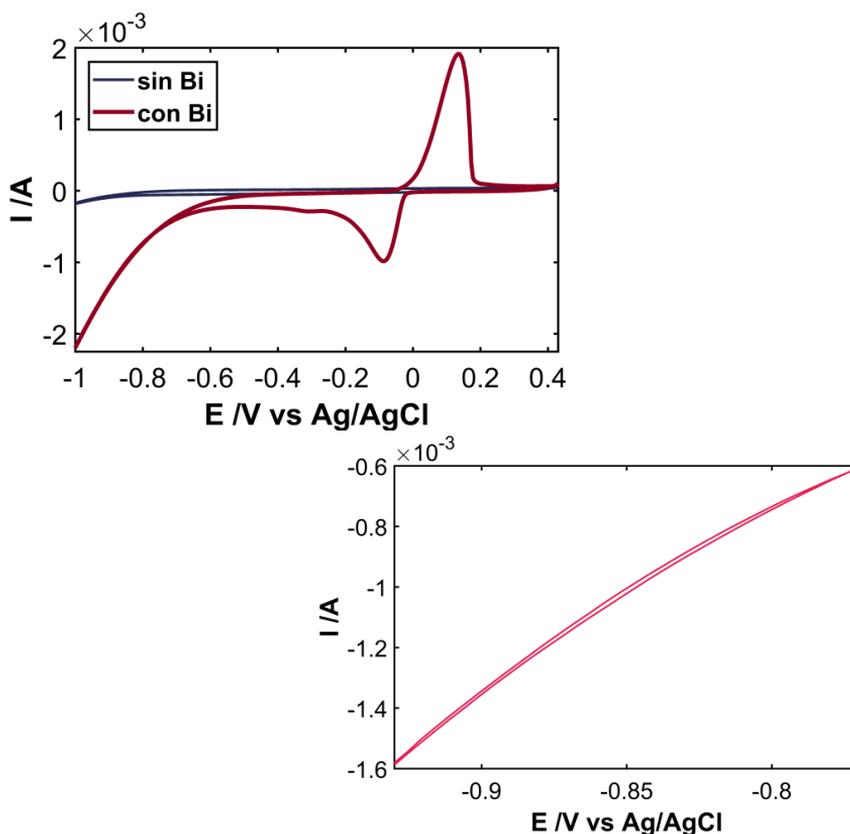
Sin embargo, la Figura 91 muestra en las experiencias voltamperométricas una señal electroquímica que crece a medida que la concentración de plomo en celda aumenta. El pico de oxidación centrado en torno a  $-0.53$  V se atribuye al proceso de oxidación del plomo metálico en la superficie del electrodo tras la deposición  $Pb^0 \rightleftharpoons Pb^{2+}$ . El segundo pico que aparece en torno a  $-0.1$  V se corresponde al bismuto como se ve cuando la concentración de  $Pb^{2+}$  es  $0 \mu g L^{-1}$ .

Presenta una buena relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de plomo pudiendo realizar una regresión robusta eliminando los puntos anómalos. La relación lineal obtenida:

$$\Delta I (A) = 2.95 \cdot 10^{-7} \cdot C_{Pb} \cdot (\mu g \cdot L^{-1}) + 3.35 \cdot 10^{-6}, R^2 = 0.992.$$

### 3. Nanohilos de bismuto

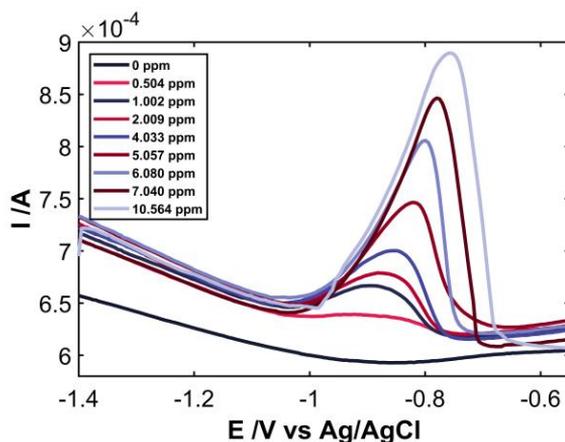
Otra forma de modificar la superficie electródica es mediante la formación electroquímica de nanohilos de bismuto (BiNWs). El crecimiento de los nanohilos se llevará a cabo sobre nuestro substrato de carbono mediante voltamperometría cíclica. Los BiNWs se formarán empleando una disolución  $1 \cdot 10^{-3}$  M de  $Bi(NO_3)_3$  en tampón acetato a pH 4.5. El barrido voltamperométrico se lleva a cabo entre  $+0.5$  V a  $-1$  V a una velocidad de barrido  $0.05$  V  $s^{-1}$ . La aplicación de un potencial catódico como  $-1$  V durante  $100$  s garantiza la formación de una película de nanohilos sobre la superficie de carbono.



**Figura 92.** Voltamperograma cíclico en un electrodo 0.4 mL CNTs/PET para una disolución con y sin  $1 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  en tampón acetato a pH 4.5.

En la Figura 92 no se observa ningún pico en ausencia de bismuto sin embargo en presencia de bismuto se observa un cruce característico en torno a -0.9 V junto a dos picos bien definidos correspondientes al pico catódico y anódico.

Siguiendo este procedimiento, se modifica la superficie del electrodo y se emplea para determinar cadmio en concentraciones crecientes mediante voltamperometría diferencial de pulsos barriendo entre -1.4 V y -0.5 V tras su deposición a -1.4 V durante 90 s.



**Figura 93. Voltamperogramas diferencial de pulsos para concentraciones crecientes de cadmio sobre un electrodo de 0.4 mL CNTs/PET modificado con BiNWs.**

La Figura 93 muestra el aumento de la señal electroquímica perteneciente al  $\text{Cd}^{2+}$  (centrado a  $-0.81$  V) a medida que aumenta la concentración entre  $0.5$  ppm y  $15.7$  ppm.

Presenta una buena relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de cadmio. Tras realizar un análisis robusto, eliminando los datos anómalos se obtiene una recta de calibrado:

$\Delta I (A) = 1.72 \cdot 10^{-5} \cdot C_{\text{Cd}^{2+}} \cdot (\text{ppm}) + 2.56 \cdot 10^{-5}$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.998$ .

## 4. Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas microscópicas con un diámetro inferior a los  $100$  nm. La modificación de la superficie electródica con ellas ha supuesto una gran revolución debido a que contribuyen a la amplificación de la señal de los analitos. En la bibliografía puede encontrarse nanopartículas de muchos metales: Sn, Bi, Au, Pt, Ag.... En este capítulo nos centraremos únicamente en las nanopartículas de bismuto y oro.

## 4.1. Nanopartículas de Bismuto

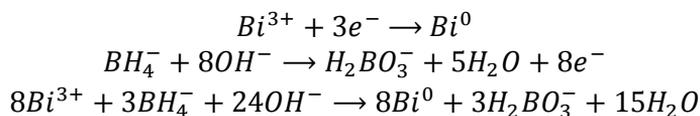
### 4.1.1. Síntesis química de BiNPs

Las nanopartículas de bismuto se sintetizan químicamente empleando una disolución 1 mM de nitrato de bismuto  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  y 10 mM de borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ). Se calienta la disolución de bismuto hasta ebullición y bajo constante agitación se procede a añadir la disolución del reductor. Inmediatamente se obtiene un sólido de color negro. Este sólido negro se filtra, se lava con abundante agua desionizada para eliminar los restos del agente reductor y finalmente se añade un poco de acetona para favorecer el secado. El sólido obtenido se guarda en un recipiente cerrado en atmósfera inerte de nitrógeno.



**Figura 94. Síntesis química de nanopartículas de bismuto.**

La reacción que tiene lugar:



#### 4.1.1.1. CNFs/Cloroformo

Las primeras pruebas con para la modificación del electrodo de nanofibras con nanopartículas de bismuto se realizarán por drop-casting. Para ello, se preparan dispersiones tanto de CNFs 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, como de nanopartículas de bismuto y de óxido de bismuto (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 4 mM.

**Tabla 22. De 1 al 6, cantidades de CNFs y Volumen de BiNPs y Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> empleados en el drop-casting. Del 7 al 12, volumen de BiNPs y Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtrados y volumen de CNFs filtrados posteriormente.**

Electrodo n <sup>o</sup>	V <sub>CNFs/CHCl<sub>3</sub></sub> , μl	V <sub>BiNPs</sub> , μl	V <sub>Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub></sub> , mL
1	300	500	
2	300		1.5
3	400	500	
4	400		1.5
5	500	500	
6	500		1.5
7	300	500	
8	400	500	
9	500	500	
10	300		1.5
11	400		1.5
12	500		1.5
13	400	700	
14	400	500	

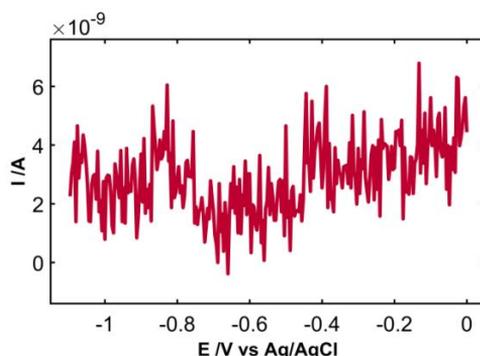
Para los electrodo del 1 al 6, se filtran las CNFs con el sistema de filtrado descrito en el Capítulo I y el volumen tanto de las nanopartículas como del óxido de bismuto se va añadiendo de poco en poco por drop-casting, evaporando el agua entre adición y adicción.

Los electrodos del 7 al 12 se filtran primero bien las BiNPs o el  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  y luego la cantidad que figura en la tabla de CNFs. Estos filtros se presan sobre una lámina de PET, para transferir el filtrado, secando 5 min el filtro y prensado a 20 tons durante 150 s.

El número 13 está fabricado a partir de un trozo de filtro con las nanopartículas disueltas en acetona. Éstas se filtran sobre la cantidad que figura en la Tabla 22 de CNFs. El número 14, las BiNPs están recién sintetizadas y se depositan por drop-casting sobre las CNFs.

A todos los electrodos se les pintan los contactos eléctricos, se les aísla y se les delimita su superficie electrodoica con la pieza de teflón con una orificio de 5.22 mm de diámetro.

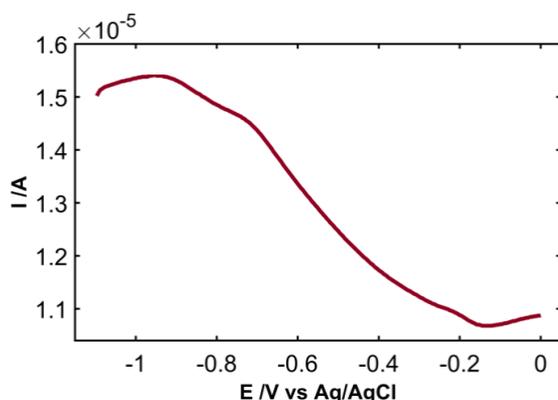
El tiempo de deposición elegido para los metales pesados será el valor óptimo obtenido en el segundo diseño de experimentos,  $t_a$ , 337.279 s.



**Figura 95. Señal electroquímica para un electrodo de CNFs/ $\text{CHCl}_3$  y BiNPs dispersadas en acetona.**

El uso del electrodo n<sup>o</sup>13 no conduce a ningún resultado. No hay señal de ninguno de los metales ( $31.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) empleados para ello. Ni modificando los parámetros de la técnica, ni añadiendo más cantidad de bismuto a la celda alcanzando una concentración de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  en celda.

El uso del electrodo n<sup>o</sup>14 tampoco nos proporciona resultados satisfactorios, Figura 96. Si bien el electrodo conduce no hay señal de ninguno de los metales ( $79 \mu\text{g L}^{-1}$ ) medidos. La concentración de bismuto en celda es  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ .



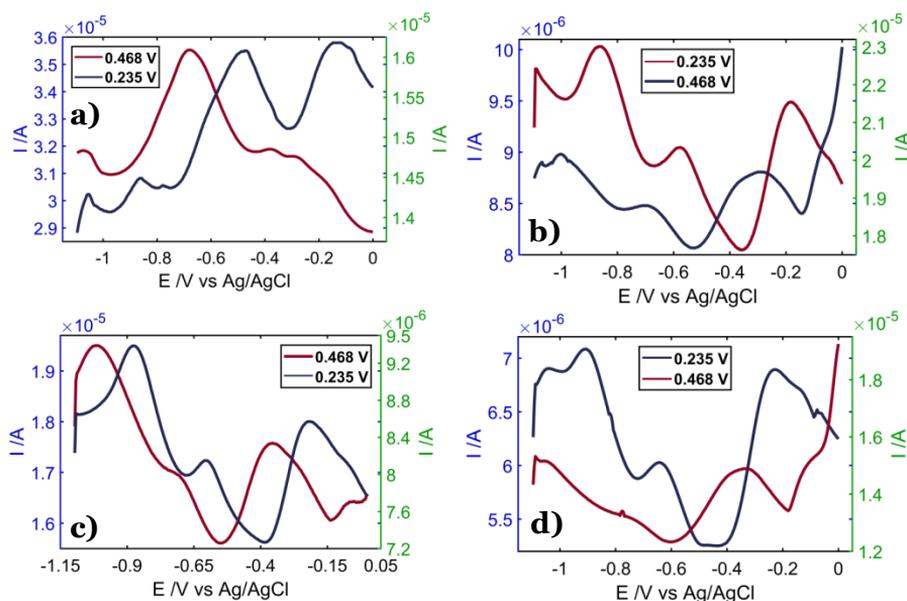
**Figura 96. Señal electroquímica del electrodo n<sup>o</sup>14 de la Tabla 22 en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Bi}^{3+}$ .**

En este electrodo, las BiNPs se depositaron por drop-casting, lo que ha podido provocar que su señal no sea la que se esperaba. Al observar el electrodo antes y después nos hace pensar que al entrar en contacto con la disolución acuosa se haya redissuelto el bismuto y que por tanto no queden las suficientes en la superficie electródica.

Con los electrodos número 7, 8 y 9 tampoco se obtienen señal en presencia de metales y bismuto. Además durante el empleo de los electrodos para determinar los metales se observa que el bismuto depositado por drop-casting sobre las nanofibras de carbono se

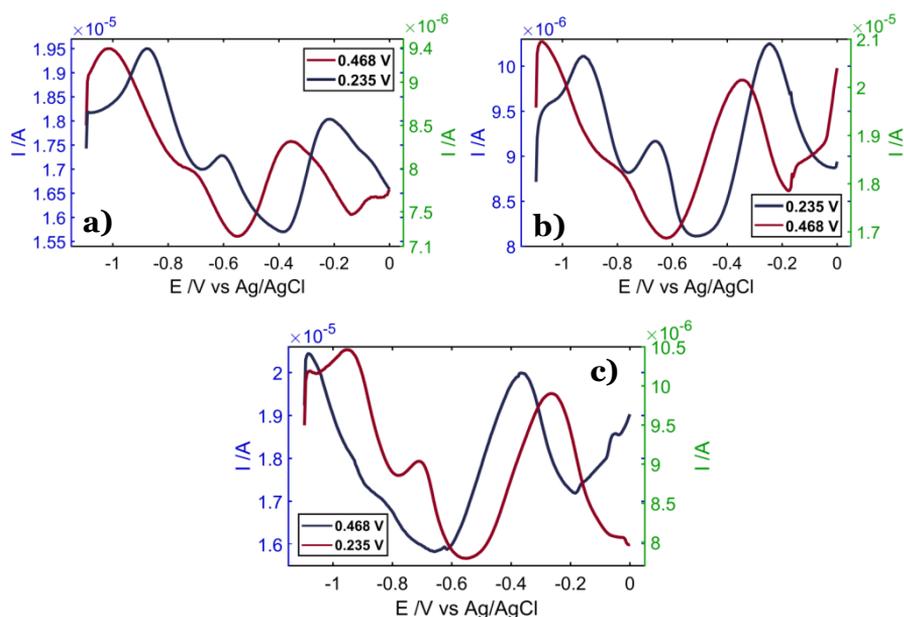
redisuelve. Lo que nos hace pensar que el drop-casting no es una opción viable para modificar la superficie de nuestros electrodos.

Como se ha podido observar, los parámetros período de pulso y anchura de pulso son importantes a la hora de determinar metales pesados. Para ello y siguiendo con las dispersiones de nanofibras en cloroformo se decide probar con el electrodo nº15 (Tabla 13) cuya superficie no ha sido modificada con bismuto. Las concentraciones empleadas para este estudio son  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de bismuto en celda y  $91 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En la Figura 97 y Figura 98 se observa la señal electroquímica de los dos metales para unos valores de anchura de pulso y período de pulso crecientes para los dos valores de amplitud óptimos obtenidos en el diseño de experimentos:  $0.468 \text{ V}$  y  $0.235 \text{ V}$ .



**Figura 97. Estudio de los parámetros anchura de pulso y período de pulso para la deposición simultánea de bismuto, plomo y cadmio. A) Anchura de pulso 0.01 s y período de pulso 0.02 s. B) Anchura de pulso 0.04 s y período de pulso 0.08 s. C) Anchura de pulso 0.08 s y período de pulso 0.16 s. D) Anchura de pulso 0.16 s y período de pulso 0.32 s.**

Como se observa para un mismo valor de amplitud, 0.235 V las señales electroquímicas son muy diferentes en función de los valores de anchura de pulso y período de pulso escogidos. En la Figura 97a se aprecia muy bien definidos los picos del bismuto y plomo y en menor medida el del cadmio. Sin embargo, en la Figura 97b y Figura 97c la señal electroquímica del cadmio se ve favorecida por los valores de anchura de pulso y período de pulso. En la Figura 97d y la Figura 98a, b y c la señal del cadmio se mantiene a pesar del aumento en los parámetros de anchura de pulso y período de pulso.



**Figura 98. Estudio de los parámetros anchura de pulso y período de pulso para la deposición simultánea de bismuto, plomo y cadmio. A) Anchura de pulso 0.32 s y período de pulso 0.64 s. B) Anchura de pulso 0.64 s y período de pulso 1.28 s. C) Anchura de pulso 1.28 s y período de pulso 2.56 s.**

Para el valor de amplitud de 0.468 V hay un cambio significativo entre la Figura 97a y la Figura 97b. En la a) aparece un pico que podría corresponderse al plomo. A medida que aumenta el valor de

los parámetros anchura de pulso y período de pulso esta señal va disminuyendo hasta casi desaparecer, aumentando la señal correspondiente al bismuto. Las mejores señales se obtienen para un valor de amplitud de 0.235 V y valores de anchura de pulso y período de pulso bajos.

**4.1.1.2. CNFs/Etanol**

A la vista que las dispersiones de nanofibras en etanol dan buenos resultados, se decide al igual que con el cloroformo filtrar nanopartículas de bismuto sobre las CNFs. En la Tabla 23 se puede ver las características de los electrodos empleados en la determinación de metales pesados.

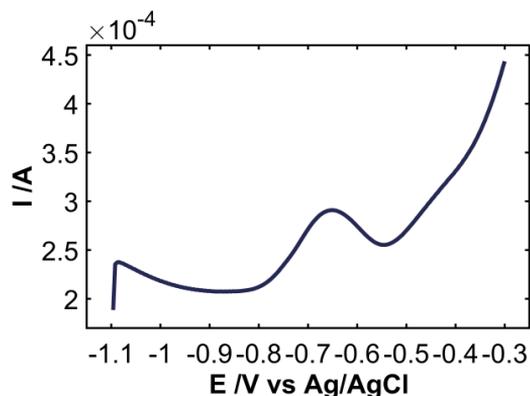
**Tabla 23. Características de fabricación de los electrodos de CNFs en etanol y posterior filtración de BiNPs sintetizadas químicamente.**

nº	V <sub>CNFs/EtOH</sub> , mL	V <sub>BiNPs</sub> , mL
1	1	1
2	1	5
3	1	0
4	0.5	1
5	0.5	5
6	0.5	0

Las medidas se realizan en un CHI 900 (CH Instruments) mediante DPASV en una celda convencional (Figura 29). Los parámetros de la técnica son:

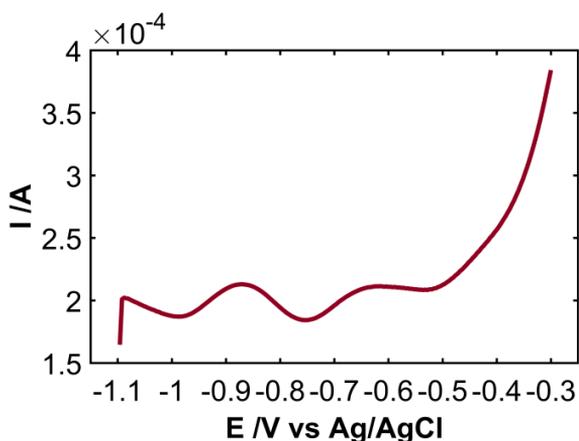
$E_{\text{preconcentración}} = -1.2 \text{ V}$        $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$       Amplitud = 0.235 V  
 $t_{\text{preconcentración}} = 337 \text{ s}$        $P_{\text{width}} = 0.04 \text{ s}$        $E_i = -1.1 \text{ V}$   
 Incremento = 4 mV       $P_{\text{period}} = 0.08 \text{ s}$        $E_f = -0.3 \text{ V}$

Para un electrodo BiNPs/CNFs/PTFE (1 mL de ambas) se obtiene solo señal de plomo a una concentración relativamente pequeña de metal,  $39.8 \mu\text{g L}^{-1}$ . A pesar de que la disolución contiene tanto plomo como cadmio, a igual concentración, el cadmio no aparece.



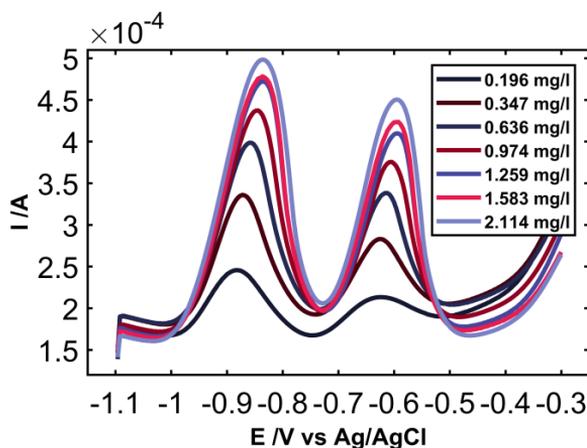
**Figura 99.** DPASV para una concentración  $39.8 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  para un electrodo BiNPs/CNFs/PTFE.

A medida que la concentración de metales aumenta en la celda, la señal electroquímica correspondiente a la oxidación del cadmio aparece más pronunciada incluso que la del plomo.



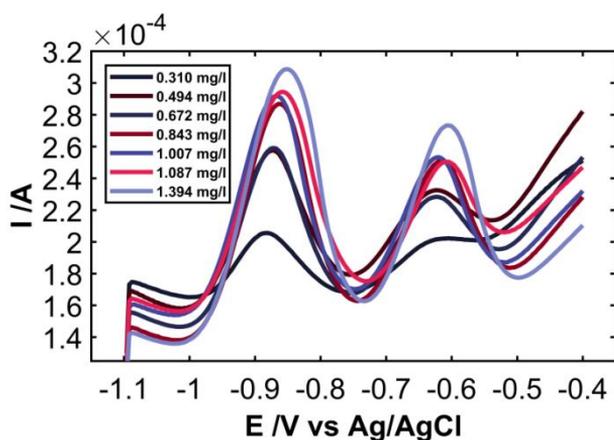
**Figura 100.** DPASV para una concentración  $118.6 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  para un electrodo BiNPs/CNFs/PTFE.

La representación de varias voltamperometrías para concentraciones crecientes de los dos metales, nos permite determinar que el electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE es viable para la determinación de estos metales.



**Figura 101. DPASV para concentraciones crecientes de plomo y cadmio para un electrodo BiNPs/CNFs/PTFE.**

Cuando se utiliza un electrodo de CNFs/PTFE de 1 mL las señales electroquímicas para ambos metales son inferiores a las obtenidas en presencia de las BiNPs.



**Figura 102. DPASV para concentraciones crecientes de plomo y cadmio para un electrodo CNFs/PTFE.**

### 4.1.1.2.1. Determinación de cadmio empleando un electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE/PET

El propósito de este apartado es presentar un nuevo dispositivo compacto Bi/CNFs/PTFE/PET fabricado mediante la filtración de dispersiones de CNFs ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y BiNPs ( $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Las disoluciones de cadmio se preparan a partir de una disolución estándar con concentración  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  en tampón acetato (HAc/NaAc) a pH 4.5. Las experiencias electroquímicas son llevadas a cabo con un CHI 900 (CH Instruments) empleando una celda de gota fabricada íntegramente en el laboratorio (Figura 15) con un sistema de 3 electrodos: como WE es el electrodo BiNPs/CNFs/PTFE/PET, el RE es un electrodo no comercial de Ag/AgCl/3M KCl y el CE es un hilo de platino. El volumen de la gota de muestra que cubre la superficie electródica del WE es  $100 \mu\text{L}$ .

#### *4.1.1.2.1.1. Optimización de los parámetros de fabricación del electrodo*

La optimización de los parámetros más influyentes en la fabricación del electrodo se llevará a cabo mediante un diseño de experimentos. Dentro de estos parámetros influyentes están la cantidad de la dispersión de nanofibras de carbono,  $C_{\text{CNFs}}$ , y de nanopartículas de bismuto,  $C_{\text{BiNPs}}$ , a filtrar. El medio para dispersar tanto las CNFs como las BiNPs es el etanol.

Con el fin de obtener los valores óptimos de estos dos parámetros,  $C_{\text{CNFs}}$  y  $C_{\text{BiNPs}}$ , se realiza un diseño de experimentos central compuesto estrella  $2^2$  con tres réplicas en el punto central con la ayuda del programa Statgraphics [287], para el que sólo 11 experiencias son necesarias. Los valores correspondientes al nivel

alto (+) y bajo (-) y al punto central de cada factor (o) son los siguientes:

$$C_{\text{CNFs}} (+) = 0.06 \text{ mg} \quad C_{\text{CNFs}} (o) = 0.04 \text{ mg} \quad C_{\text{CNFs}} (-) = 0.02 \text{ mg}$$

$$C_{\text{BiNPs}} (+) = 0.48 \text{ mg} \quad C_{\text{BiNPs}} (o) = 0.33 \text{ mg} \quad C_{\text{BiNPs}} (-) = 0.18 \text{ mg}$$

La concentración de cadmio empleada para las experiencias del diseño es 200 ppb en tampón acetato (HAc/NaAc) a pH 4.5. El cadmio se preconcentra a -1.4 V durante 180 s (se reduce y se acumula sobre la superficie del WE) y a continuación se lleva a cabo su redisolución barriendo entre -0.85 V y -0.6 V (amplitud 50 mV, anchura de pulso 0.25 s y período de pulso 0.65 s) evitando los potenciales en los que las BiNPs se redisuelven. La variable respuesta empleada es la intensidad de pico correspondiente a la redisolución del Cd<sup>2+</sup>.

La Tabla 24, muestra la variabilidad para cada una de las variables.

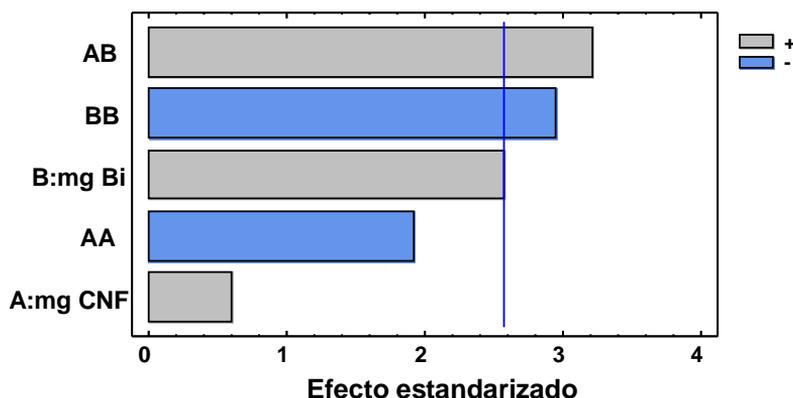
**Tabla 24. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:mg CNF	0.121	1	0.121	0.36	0.573
B:mg Bi	2.20	1	2.20	6.59	0.050
AA	1.23	1	1.23	3.68	0.113
AB	3.45	1	3.45	10.35	0.024
BB	2.91	1	2.91	8.72	0.032
Error total	1.67	5	0.33		
Total (corr.)	10.74	10			

R<sup>2</sup> = 84.5 por ciento.

R<sup>2</sup> (ajustada por g.l.) = 68.9 por ciento.

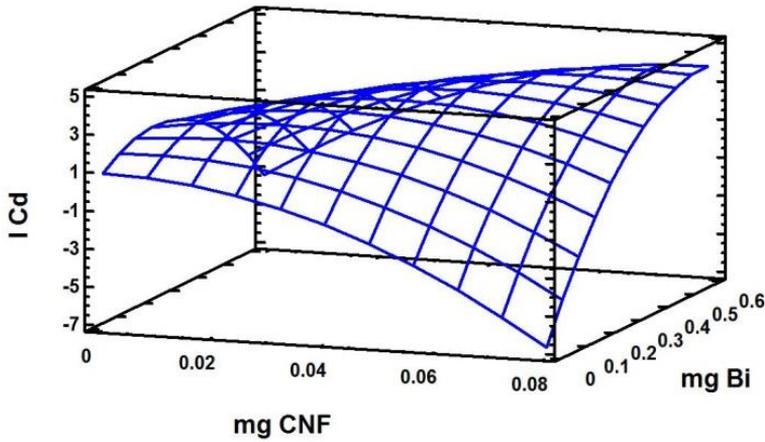
El estadístico R<sup>2</sup> indica que el modelo, así ajustado, explica el 84.5% de la variabilidad en I<sub>p</sub>. El estadístico R<sup>2</sup> ajustado, que es el más adecuado para comparar modelos cuando tienen el número de variables independientes diferente, es 68.9%.



**Figura 103. Diagrama de Pareto para  $I_p$ .**

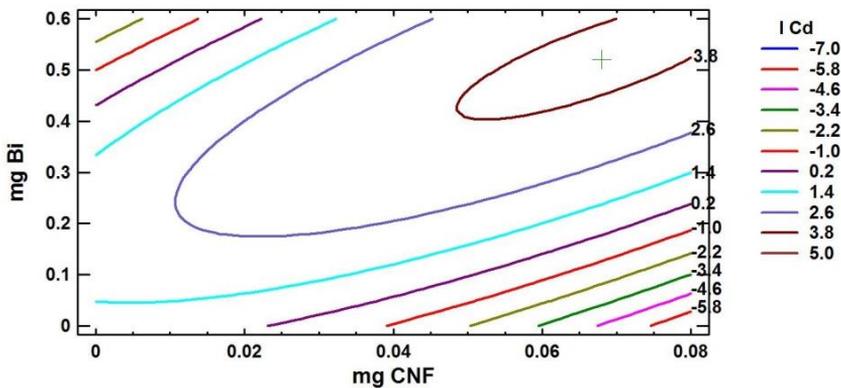
En este caso hay 2 efectos, la interacción consigo misma de la cantidad de BiNPs y la interacción de la cantidad de BiNPs con la de CNFs que tienen un valor-p menor de 0.05 (Tabla 24), indicando que es significativamente diferente de cero a un nivel de confianza del 95% y por tanto estas interacciones afectan a la respuesta. Esto también se puede apreciar en la Figura 103. La cantidad de CNFs no tiene ningún efecto sobre la variable respuesta. Esto indica que la cantidad de CNFs filtrada es lo suficientemente alta para fabricar electrodos con buena conductividad. Por el contrario, la cantidad de BiNPs es importante debido a que la señal de redisolución del  $Cd^{2+}$  se ve afectada por la cantidad de bismuto. A mayor cantidad de BiNPs mejor señal del cadmio se obtiene.

La Figura 104 muestra la superficie de respuesta estimada, y muestra una tendencia en la que se obtiene mejor respuesta para una cantidad alta de CNFs y baja para BiNPs.



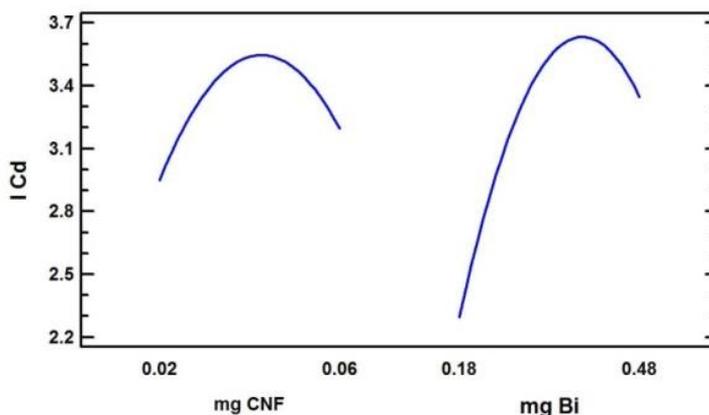
**Figura 104. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 105, que muestra la superficie de respuesta estimada. En ella la respuesta de redisolución del Cd<sup>2+</sup> muestra un máximo para 0.068 mg de CNFs y 0.52 mg de BiNPs.



**Figura 105. Superficie de respuesta estimada para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 106 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos.



**Figura 106. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

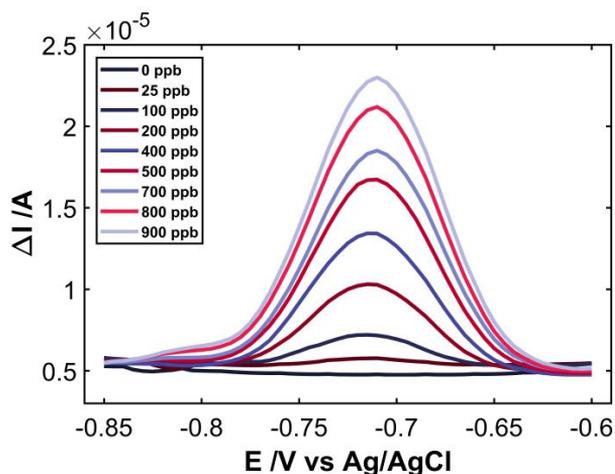
En la Figura 106 se aprecia que el efecto de la cantidad de CNFs y Bi sobre el sistema no es lineal. A medida que aumentan, la intensidad de la señal del cadmio aumenta hasta alcanzar un máximo. Si se sigue aumentando la cantidad de Bi y CNFs se produce un cambio en el comportamiento de la variable respuesta, disminuyendo gradualmente.

Según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas en el proceso de diseño de los electrodos de BiNPs y CNFs de cada factor experimental son:

$$C_{\text{CNFs}} = 0.068 \text{ mg y } C_{\text{BiNPs}} = 0.52 \text{ mg}$$

#### 4.1.1.2.1.2. *Detección de Cadmio*

Una vez optimizados los factores significativos implicados en la fabricación del electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE/PET se lleva a cabo la determinación de cadmio para un rango de concentración entre 25 y 900 ppb. La técnica empleada es la voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución anódica (DPASV) aplicando los parámetros anteriormente descritos.



**Figura 107. Voltamperometría diferencial de pulso a concentraciones crecientes de  $\text{Cd}^{2+}$  (25 - 900 ppb) para un electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE/PET.**

Los voltamperogramas obtenidos durante la redisolución del cadmio presentan una buena relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$ . Tras llevar un análisis robusto por regresión por mínimos cuadrados (LMS) se obtiene la recta:  $\Delta I (\text{A}) = 1.83 \cdot 10^{-8} \cdot C_{\text{Cd}^{2+}} (\text{ppb}) - 2.99 \cdot 10^{-7}$ . El coeficiente de determinación y el error estándar residual son  $R^2 = 0.999$  y  $S_{yx} = 2.28 \cdot 10^{-7}$ . Además se calcula el límite de detección con el modelo lineal obteniendo un valor de 53.57 ppb de  $\text{Cd}^{2+}$ .

Con estos resultados se analiza la reproducibilidad del método empleando las pendientes de 3 calibrados diferentes obtenidos para 3 electrodos de BiNPs/CNFs/PTFE/PET distintos bajo las mismas condiciones experimentales. La media de las pendientes  $1.83 \cdot 10^{-8} \pm 8.02 \cdot 10^{-10} \cdot \text{A} \cdot \text{ppb}^{-1}$  y la desviación estándar relativa  $\% \text{RSD} = 2.52\%$ ,  $n=3$  indican que estos electrodos muestran una buena reproducibilidad.

Por último se evalúa el electrodo para dos muestras, una a concentración conocida y otra desconocida. Para la concentración conocida de 600 ppb se comprueba la capacidad predictora del método para los electrodos diseñados. El valor de predicción obtenido es  $617.1 \pm 30.7$  ppb y su  $RSD=4.06\%$ ,  $n=3$ , indica la buena actuación para la determinación de cadmio. Una muestra de agua del grifo (concentración desconocida) se estudia empleando DPASV para nuestro electrodo. La concentración de  $Cd^{2+}$  estimada para el electrodo BiNPs/CNFs/PTFE/PET es 96.8 ppb ( $\%RSD=0.68\%$ ,  $n=3$ ).

### 4.1.2. Síntesis electroquímica de BiNPs

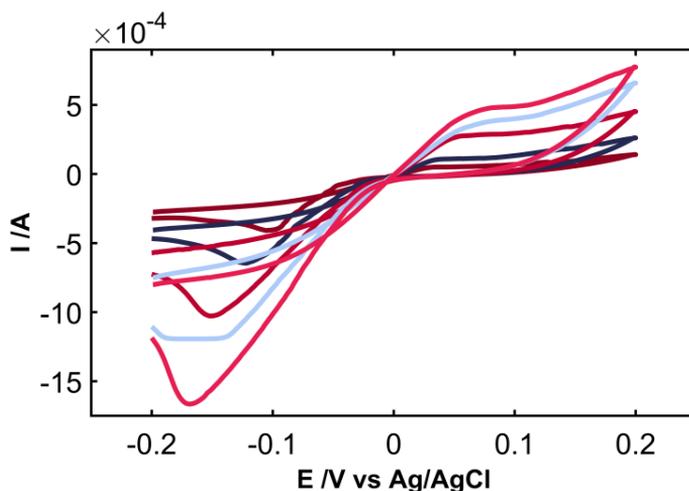
Las nanopartículas de bismuto como ya se ha visto se pueden sintetizar químicamente, pero al igual que ocurre con las de oro, las de bismuto se pueden sintetizar también electroquímicamente. Para la síntesis electroquímica de las nanopartículas de bismuto se ha empleado una disolución 0.15 M de  $Bi(NO_3)_3$ , 0.3 M de ácido tartárico, 0.65 M de  $HNO_3$ , 1 M de  $KNO_3$  y glicerol al 10 % [82]. El procedimiento descrito en este artículo conlleva dos técnicas:

- ❖ Voltamperometría cíclica. Barriendo entre -0.2 V y +0.2 V a una velocidad de barrido de  $20 \text{ mV s}^{-1}$  tras depositar.
- ❖ Amperometría de triple pulso (TPA). Para oxidar a +0.18 V durante 5 s, nuclear a +0.18 V durante 5 ms y el crecimiento a -0.075 V durante 50 s.

#### 4.1.2.1. CNFs/Cloroformo

Se emplea uno de los electrodos de CNFs dispersadas en cloroformo, al que se va someter a una voltamperometría cíclica entre -0.3 V a +0.2 V a -0.3 V. Se preconcentra a 0.18 V durante 5 s

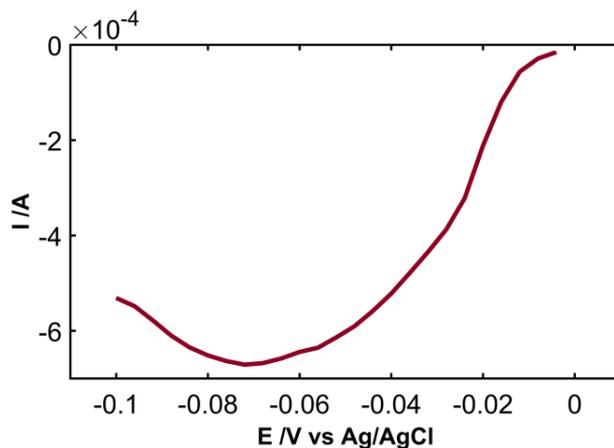
(oxidación), +0.18 V durante 5 ms (nucleación) y -0.075 V durante 50 s (crecimiento).



**Figura 108. Voltamperometría cíclica para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

En el barrido anódico se observa la oxidación de las nanopartículas de bismuto, para posteriormente reducirlas en el barrido catódico. Debido a la diferencia entre los potenciales de deposición y de disolución se produce un cruce entre las señales de ambos barridos, catódico y anódico. Este cruce nos indica que se están formando núcleos sobre el electrodo. Este cruce nos da una idea de los potenciales que se pueden aplicar en la cronoamperometría para favorecer la formación de los núcleos y posteriormente su crecimiento.

El empleo de la técnica amperometría de tripe pulso con los pulsos descritos anteriormente nos permite obtener la Figura 109.



**Figura 109. Amperometría de tripe pulso para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

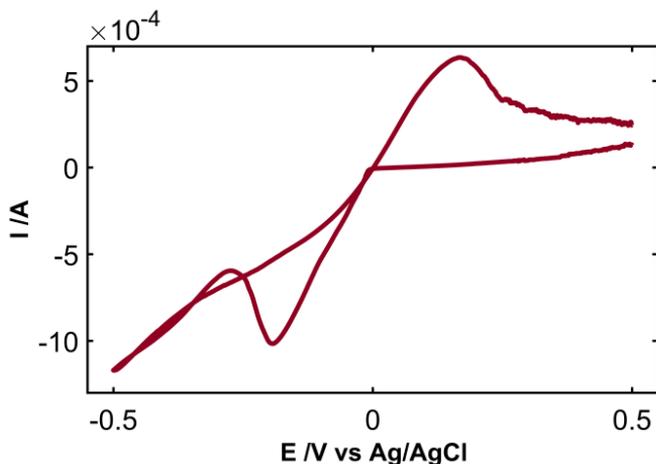
En la figura se observa la redisolución de las nanopartículas de bismuto formadas sobre el electrodo de trabajo tras aplicar tres pulsos.

Para llevar a cabo estas experiencias, tanto por voltamperometría cíclica como por cronoamperometría se van a preparar electrodos cuyas características vienen recogidas en la Tabla 25.

**Tabla 25. Características de fabricación de los electrodos de CNFs/ $\text{CHCl}_3$ .**

Nº	$V_{\text{CNFs/CHCl}_3}$ , $\mu\text{l}$	$t_s$ , min	P, tons	t, s
1	1000	5'	20	150
2	1000	5'	20	150
3	1000	5'	20	150
4	800	5'	20	150
5	800	5'	20	150
6	800	5'	20	150
7	1000	5'	20	150

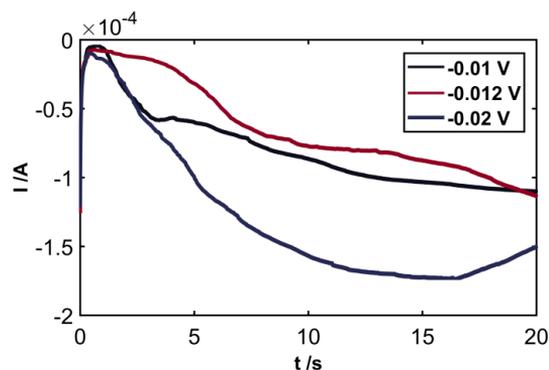
El empleo de la voltamperometría cíclica con la disolución de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , ácido tartárico,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  y glicerol para los electrodos de la Tabla 25 nos permite obtener la Figura 110.



**Figura 110. Voltamperometría cíclica para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

En la Figura 110 se observa en el barrido catódico la reducción de bismuto para posteriormente oxidarse en el barrido anódico. Además se puede apreciar un pequeño cruce entre las señales de ambos barridos lo que indica la formación de núcleos de bismuto sobre la superficie electroda. Este cruce da idea de los potenciales que se usarán para llevar a cabo las medidas cronoamperométricas.

Para tres potenciales diferentes (-0.01 V, -0.012 V y -0.02 V), obtenidos en la voltamperometría previa realizada, se lleva a cabo una cronoamperometría. La representación de las tres experiencias se recoge en la Figura 111.



**Figura 111. Cronoamperometría para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

Para un potencial de  $-0.02\text{ V}$  se observa como la corriente aumenta debido a la formación y el crecimiento de núcleos de bismuto hasta un máximo de corriente. Posteriormente la corriente disminuye debido a la difusión de los átomos de bismuto de la disolución mientras los núcleos siguen creciendo. A partir de los 15 s de experiencia se observa otro crecimiento de la señal debido a la formación de una película de bismuto.

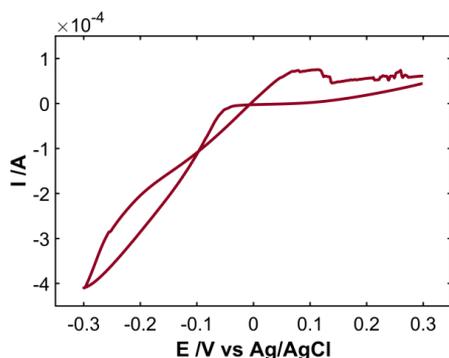
#### 4.1.2.2. CNFs/Etanol

Las experiencias previas realizadas con dispersiones de nanofibras de carbono en etanol han arrojado buenos resultados, por lo que se decide utilizarlas para fabricar electrodos que se modificaran con nanopartículas de bismuto sintetizadas electroquímicamente.

##### 4.1.2.2.1. Electroquímica

Para llevar a cabo la formación de las nanopartículas de bismuto electroquímicamente se emplea como electrodo de trabajo un electrodo CNFs/PTFE/PET delimitada su área con una pieza de teflón con un orificio de 5 mm de diámetro, como electrodo de referencia un electrodo no comercial de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{ M KCl}$  y un hilo de platino como contraelectrodo.

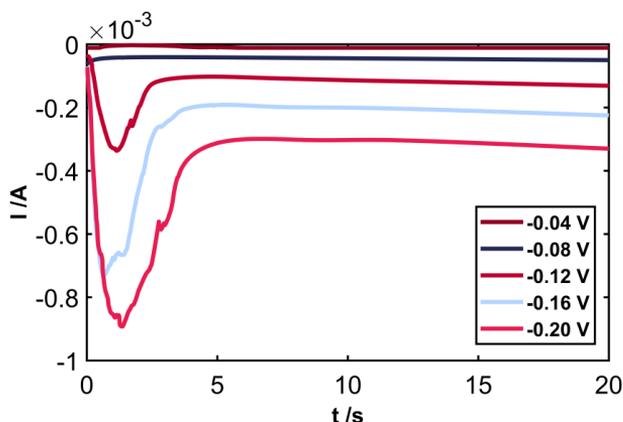
Se llevan a cabo una voltamperometría cíclicas entre +0.3 V y -0.3 V.



**Figura 112. Voltamperometría cíclica para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

Por la Figura 112 vemos en el barrido anódico como se empieza a depositar bismuto, para posteriormente oxidarse. La presencia del bucle es consistente con un proceso de nucleación seguido de un crecimiento controlado por difusión.

La aplicación de diferentes potenciales, seguidos de una cronoamperometría nos permite obtener la Figura 113. En este se aplica un precondicionamiento de 10 s para un potencial de +0.5 V.



**Figura 113. Cronoamperometría para la síntesis electroquímica de BiNPs.**

En la Figura 113 los potenciales  $-0.04\text{ V}$  y  $-0.06\text{ V}$  no presentan el cronoamperograma típico de un proceso de nucleación. Su señal es debida a la descarga de la doble capa. Sin embargo, para los otros tres potenciales de la figura ( $-0.12\text{ V}$ ,  $-0.16\text{ V}$  y  $-0.20\text{ V}$ ) se observa el crecimiento de la intensidad debido a procesos de nucleación y crecimiento.

A la vista de que las experiencias electroquímicas para la síntesis de nanopartículas de bismuto dan buenos resultados, se decide incluir al proceso las técnicas espectroscópicas para el seguimiento de la formación de las nanopartículas de bismuto.

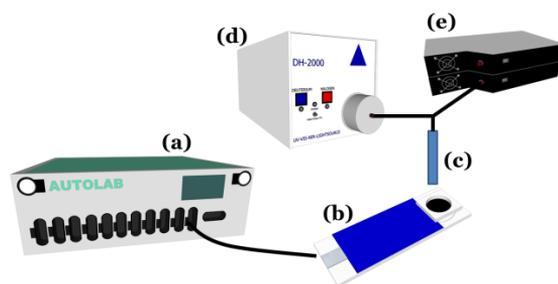
#### 4.1.2.2.2. Espectroelectroquímica

La espectroelectroquímica es una técnica de respuesta múltiple en la que técnicas electroquímicas y espectroscópicas se combinan para obtener simultáneamente información de distinta naturaleza, y nos permite estudiar y comprender los procesos y sistemas. Según la posición de la radiación electromagnética respecto a la superficie del electrodo podemos distinguir:

- a) Espectroelectroquímica en configuración normal.
  - a. Transmisión (se necesitan electrodos ópticamente transparentes).
  - b. reflexión
- b) Espectroelectroquímica en configuración paralelo.
- c) Espectroelectroquímica bidimensional.

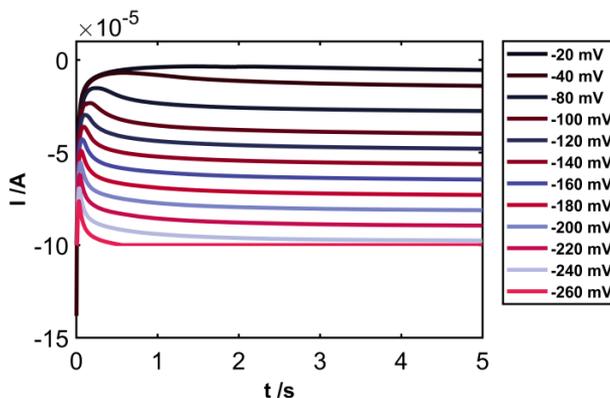
En este caso utilizaremos la configuración normal en reflexión. La señal óptica nos da información sobre los procesos que están teniendo lugar en la superficie del electrodo de trabajo y en la solución adyacente a él.

El sistema empleado para llevar a cabo la técnica espectroelectroquímica está compuesto de un potenciostato/galvanostato (PGSTAT302N, Metrohm, Autolab), un detector, una fuente halógena y deuterio y una sonda. Esta sonda se coloca lo más cerca posible de la superficie electródica.



**Figura 114.** Esquema de los instrumentos necesarios para llevar a cabo medidas espectroelectroquímicas. (a) Potenciostato, (b) Electrodo, (c) sonda, (d) Lámpara y (e) Detector.

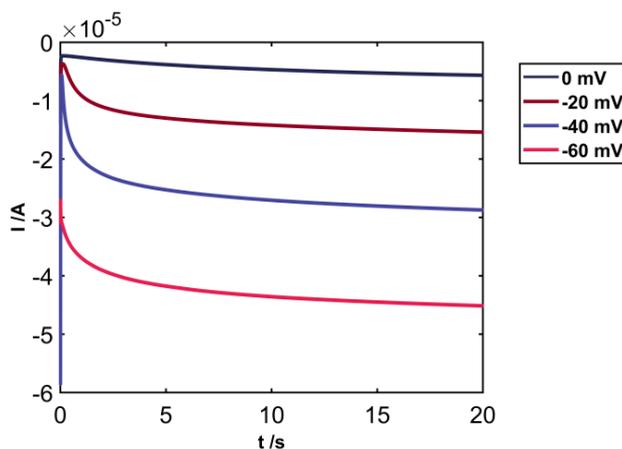
El electrodo de nanofibras de carbono se modificará con las nanopartículas de bismuto utilizando la disolución de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  en ácido tartárico,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  y glicerol,  $\text{pH} = 0$ . Se aplicarán diferentes potenciales siguiendo la evolución de la señal frente al tiempo. Los cronoamperogramas se registran aplicando potenciales de reducción entre  $-0.02 \text{ V}$  y  $-0.26 \text{ V vs Ag/AgCl/3M KCl}$ .



**Figura 115.** Cronoamperometría para la síntesis electroquímica de BiNPs a diferentes potenciales de inicio.

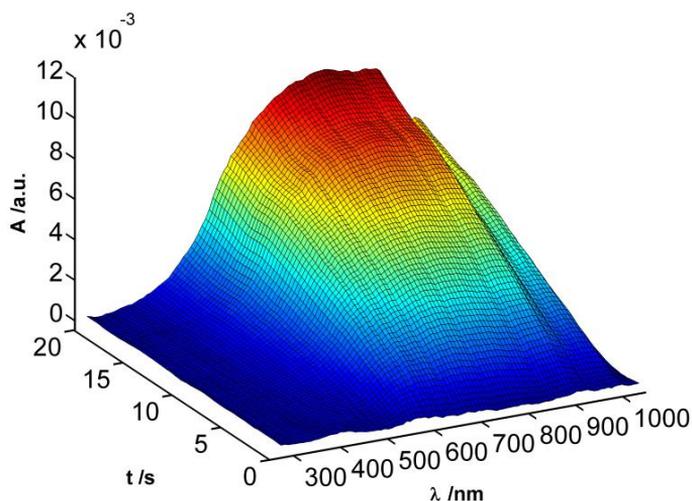
La característica más importante de las curvas  $I$  (A) *vs.*  $t$  (s) es la sección ascendente correspondiente al crecimiento del área electroactiva, característico de los procesos de nucleación y crecimiento.

Además, la observación de pequeñas variaciones en el espectro de absorción al formarse las nanopartículas de bismuto sobre el electrodo de nanofibras de carbono nos lleva a utilizar las técnicas electroquímicas. Con la misma sonda se comprobó la transparencia del electrodo, observando que la luz traspasaba el electrodo. Se lleva cabo la cronoamperometría a un potencial dado y el espectro de absorción. El cronoamperograma a 4 potenciales: 0 V, -0.02 V, -0.04 V y -0.06 V.



**Figura 116. Síntesis de BiNPs, cronoamperogramas a 4 potenciales distintos.**

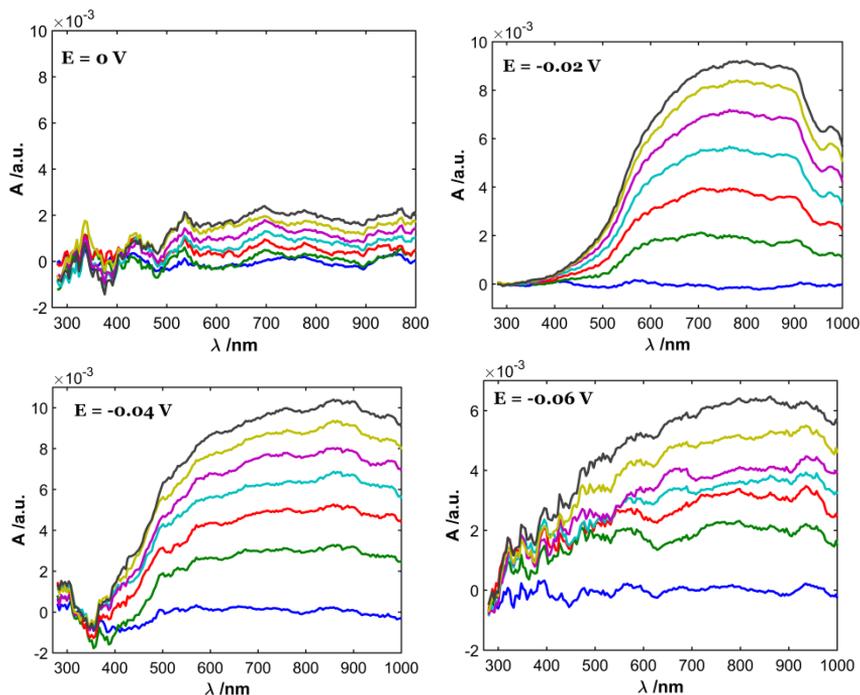
En la Figura 116 se aprecia el cronoamperograma típico para la síntesis electroquímica de nanopartículas. Para -0.04 V se observa como aumenta la intensidad debido al aumento de la superficie electroactiva. Esto se debe a la formación de núcleos de bismuto y a su posterior crecimiento.



**Figura 117. Espectro en 3D de la absorbancia vs el tiempo y longitud de onda a -0.02 V.**

Los espectros de absorbancia UV-Visible se registran simultáneamente a los cronoamperogramas. Aunque en el primer cronoamperograma, a -0.02 V, no existen cambios de corriente significativos, sin embargo el espectro UV-Vis muestra un incremento continuo de la absorbancia durante los 20 s que dura la experiencia al potencial -0.02 V. La evolución tiene lugar en dos bandas diferentes, siendo la más importante la centrada alrededor de 800 nm. Esto se puede observar con mayor claridad en la Figura 118 para los 4 potenciales empleados.

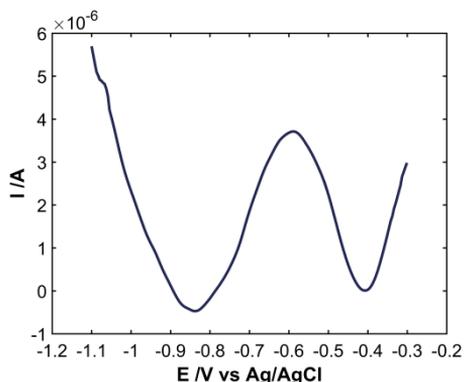
Al igual que se observa para el cronoamperograma a 0 V no hay un cambio de corriente significativo, solo la descarga correspondiente a la doble capa. Esto es congruente con lo observado en la Figura 118, en la que no se observa ningún incremento de la absorbancia.



**Figura 118. Representación Absorbancia vs Longitud de onda para 0 V, -0.02 V, -0.04 V y -0.06 V.**

Para -0.02 V el cronopotentiograma muestra un ligero cambio en la intensidad de corriente, mostrando la señal típica de la formación y crecimiento de los núcleos. Esto se aprecia más claramente en la Figura 118 en la que se observa el crecimiento de la absorbancia a lo largo de la experiencia para la banda centrada en torno a 800 nm. El espectro a -0.04 V muestra el aumento de la absorbancia para la banda a 800 nm, debido a que como se aprecia en el cronopotentiograma correspondiente, se produce un aumento de la intensidad debido al aumento del área electroactiva. Sin embargo para -0.06 V tanto en su espectro como en el cronopotentiograma se produce una disminución de la absorbancia y de la intensidad de corriente.

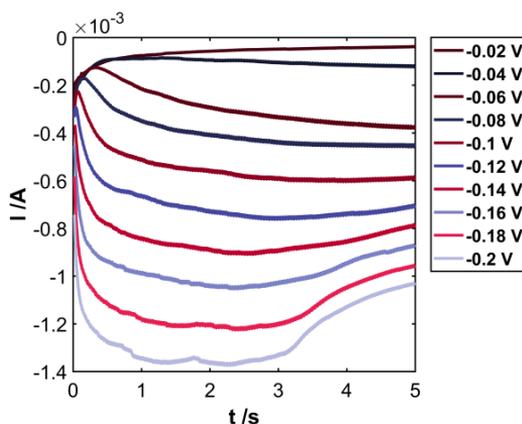
Con el electrodo modificado electroquímicamente con la película de bismuto se va a determinar dos metales pesados, plomo y cadmio  $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 119. Señal de  $\text{Pb}^{2+}$  para un electrodo BiF/CNFs depositadas electroquímicamente.**

La Figura 119 muestra el pico de oxidación correspondiente al plomo tras la formación de una película de nanopartículas de bismuto electroquímicamente.

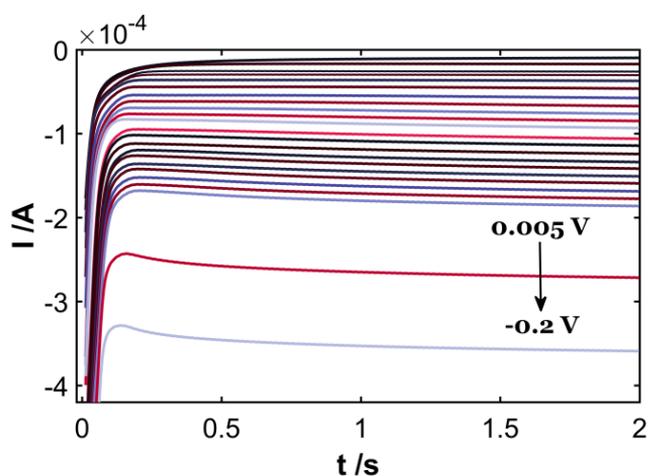
La repetición de las experiencias con un electrodo de 0.5 mL CNFs/PTFE, nos permite ver por las cronoamperometrías la formación de la película de bismuto.



**Figura 120. Cronoamperometrías sobre un electrodo de CNFs/PTFE a potenciales de inicio entre -0.02 V y -0.2 V.**

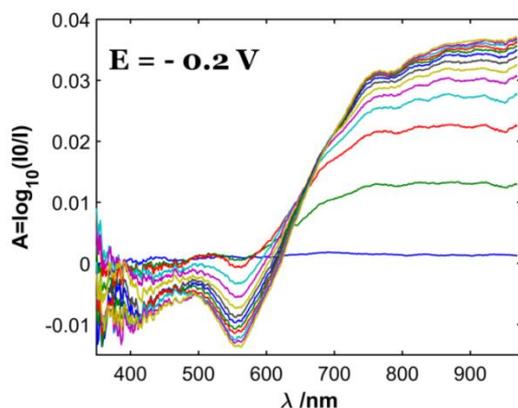
En la Figura 120 se observa que a partir de  $-0.06$  V se produce una nucleación y crecimiento de las nanopartículas de bismuto, fenómeno que desaparece a partir de  $-0.18$  V donde a partir de los 3 s de la experiencia ya no hay solamente nanopartículas en la superficie sino que se ha formado una película de bismuto.

Para un electrodo de 1 mL de CNFs se realizan sucesivas cronoamperometrías con potenciales de inicio entre  $+0.05$  V y  $-0.20$  V con un incremento de  $-0.005$  V.



**Figura 121. Cronoamperometrías a diferentes potenciales para un electrodo 1 mL CNFs/PTFE.**

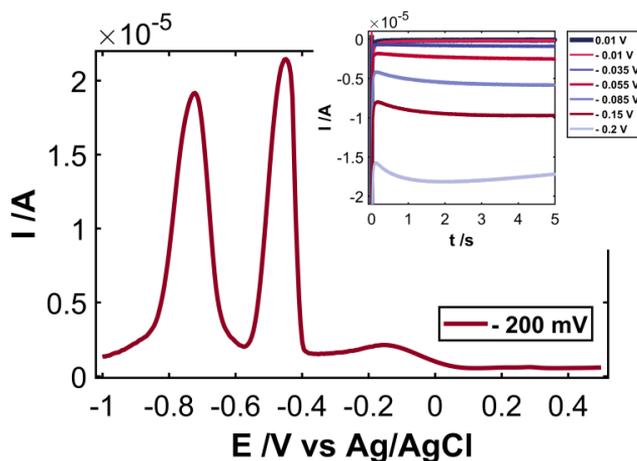
El espectro de absorbancia para el potencial  $-0.2$  V de la Figura 122 muestra dos bandas, siendo la banda centrada alrededor de  $870$  nm la involucrada en la formación de la película de bismuto. Esta banda evoluciona a medida que avanza la experiencia cronoamperométrica.



**Figura 122. Espectro de absorbancia para un potencial de -0.2 V.**

Para la banda centrada en torno a 550 nm, su absorbancia disminuye a medida que evoluciona la experiencia. Esto nos indica que en el medio se ha generado una especie que se consume para generar la banda correspondiente a las películas de bismuto.

El empleo de una cronamperometría a distintos potenciales sobre un electrodo de 1 mL CNFs/PTFE/PET nos permite formar una película de bismuto.



**Figura 123. Voltamperometria diferencial de pulsos de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  sobre un electrodo de BiF/CNFs/PTFE/PET. Y la cronamperometría a diferentes potenciales.**

El cronoamperograma a  $-0.2$  V de la Figura 123 nos muestra la formación de nanopartículas (nucleación y crecimiento) y al final la formación de la película de bismuto. El barrido de una disolución  $10$  ppm de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (deposición a  $-1.4$  V durante  $90$  s; amplitud  $50$  mV) para la película formada a  $-0.2$  V nos permite observar las señales electroquímicas correspondientes al cadmio (centrada a  $-0.78$  V) y el plomo (en torno a  $-0.5$  V).

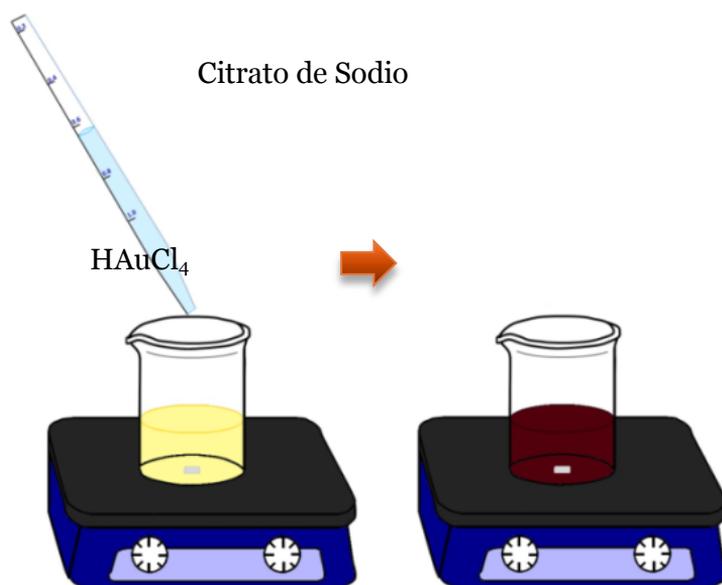
A la vista de los resultados, las técnicas espectroelectroquímicas son útiles en el seguimiento de la formación de la película de nanopartículas de bismuto. Además, esta película formada es lo suficientemente estable como para llevar a cabo medidas de redisolución de metales pesados.

## **4.2. Nanopartículas de Oro**

### **4.2.1. Síntesis química de AuNPs**

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo mediante el método de Turkevich [81]. Este método es altamente empleado por su simplicidad ya que solo es necesario emplear ácido tetracloroáurico y citrato de sodio.

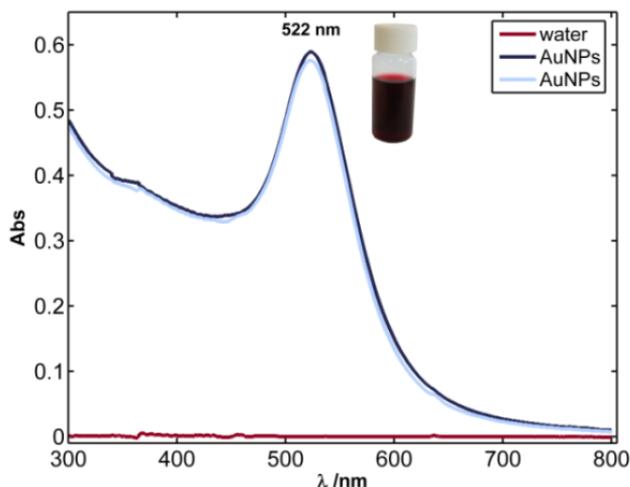
Para la síntesis se prepara una disolución  $1 \times 10^{-3}$  M de ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) y  $0.038$  M de citrato de sodio. Ambas disoluciones se calientan y a  $20$  mL de la disolución de  $\text{HAuCl}_4$  se le añaden  $2$  mL de la disolución de citrato de sodio. Rápidamente se aprecia el cambio de color de incoloro a vino.



**Figura 124. Proceso de síntesis de nanopartículas de oro.**

Se deja 15 minutos bajo constante agitación y calor para la formación completa de las nanopartículas. Es muy importante añadir el citrato sobre el H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> y no al revés debido se reduce la homogeneidad de la mezcla entre ambos reactivos provocando un solapamiento entre la nucleación el crecimiento de las nanopartículas [291].

La disolución de nanopartículas de oro se analiza mediante espectroscopía UV-Vis en espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240. Las cubetas empleadas son de cuarzo (Hellma Analytics, 100-QS) con una ventana óptica de 10 mm.



**Figura 125. Espectro UV-Vis de nanopartículas de oro sintetizadas químicamente mediante el método de Turkevich.**

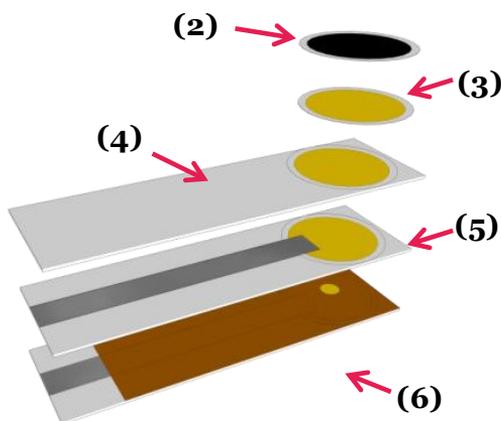
La aparición de una banda a 522 nm indica la presencia de nanopartículas de oro. La anchura de la banda demuestra que las nanopartículas de oro sintetizadas químicamente son homogéneas. Tampoco se aprecian otras bandas, lo que indica que la disolución se encuentra limpia de restos de los reactivos iniciales.

### *4.2.1.1. Fabricación de electrodos*

El proceso de fabricación de los electrodos es muy sencillo. El proceso es el siguiente:

1. Se prepara una dispersión de CNTs en DCE 0.5 mg/100 mL.
2. Se filtra un volumen de CNTs en un filtro de Teflón<sup>®</sup> con tamaño de poro 0.1  $\mu\text{m}$ . Se seca el filtro con una corriente de nitrógeno.
3. Se filtra 1.5 mL de la disolución de AuNPs sobre el filtro con CNTs y se seca el filtro con una corriente de nitrógeno.
4. Se fija el filtro sobre una lámina de PET con un poco de pintura aislante comercial.

5. Se pinta las conducciones eléctricas con pintura de plata y se seca a 70°C durante 40 min.
6. Se delimita el área y se aísla el sistema con una lámina de capton<sup>®</sup> que tiene un orificio de 2 mm de diámetro.

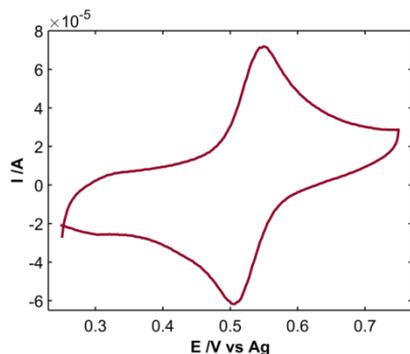


**Figura 126.** Pasos de fabricación de un electrodo de AuNPs/CNTs/PTFE.

#### 4.2.1.2. Determinación de dopamina

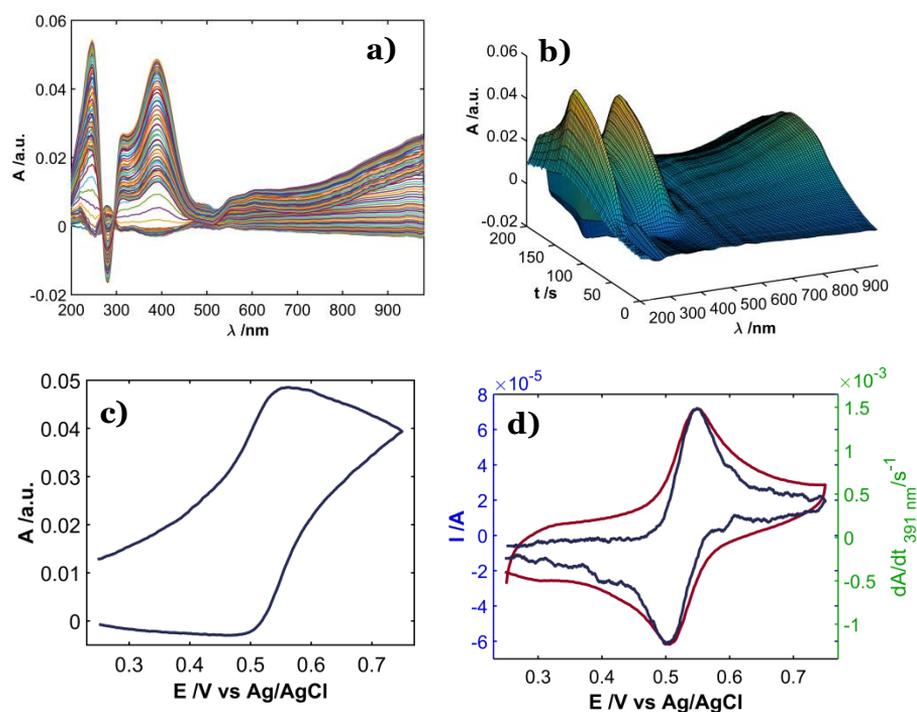
Además, el empleo de este analito nos permite utilizar técnicas espectroelectroquímicas debido a que la dopamina presenta una banda en torno a 391 nm.

Para este propósito se realiza una voltamperometría cíclica colocando la sonda cerca de la superficie electródica para obtener la mayor cantidad de luz posible. La Figura 127 muestra las respuestas espectroelectroquímicas obtenidas durante la experiencia voltamperométrica a  $0.005 \text{ V s}^{-1}$  entre  $+0.25 \text{ V}$  y  $+0.75 \text{ V}$  para  $1 \text{ mM}$  de dopamina en  $0.1 \text{ M HClO}_4$  en un electrodo  $1.5 \text{ mL CNTs}/1.5 \text{ mL AuNPs/PTFE/PET}$ .



**Figura 127. Voltamperometría cíclica para dopamina 1 mM en 0.1 M HClO<sub>4</sub>.**

La figura muestra la oxidación de la dopamina a dopamina quinona (mecanismo en la Figura 52).



**Figura 128. Señales electroquímicas obtenidas para dopamina 1 mM en 0.1 M HClO<sub>4</sub> para un voltamperometría cíclica. a) Espectro UV-Vis, b) Representación 3D absorbancia vs potencial/tiempo, c) Voltabsorciograma a 391 nm y d) derivada del voltabsorciograma a 391 nm y voltamperograma cíclico.**

La Figura 127 muestra la respuesta electroquímica de la dopamina registrada a lo largo del experimento donde se aprecia la oxidación a +0.55 V durante el barrido anódico y su correspondiente reducción a +0.51 V en el barrido catódico. La Figura 128a muestra la señal espectral UV-Vis de la dopamina, en el que la banda principal centrada a 391 nm crece a medida que la experiencia evoluciona. La Figura 128b muestra los cambios espectrales en 3D, mostrando lo mismo que en la Figura 128a, la banda a 391 nm crece durante el barrido de ida y luego decrece. Esta banda está relacionada con la oxidación de la dopamina.

El voltabsorciograma a 391 nm, Figura 128c, muestra el crecimiento de la absorbancia de manera progresiva mientras el potencial se encuentra por debajo de +0.5 V originando un producto que se reduce fácilmente en el barrido contrario. Durante el barrido catódico la absorbancia a 391 nm decrece cuando el potencial aplicado es inferior a +0.55 V. La Figura 128d muestra la derivada del voltabsorciograma a 391 nm junto al voltamperograma de la dopamina. La derivada es igual al voltamperogramas mostrando los mismos resultados que la señal electroquímica.

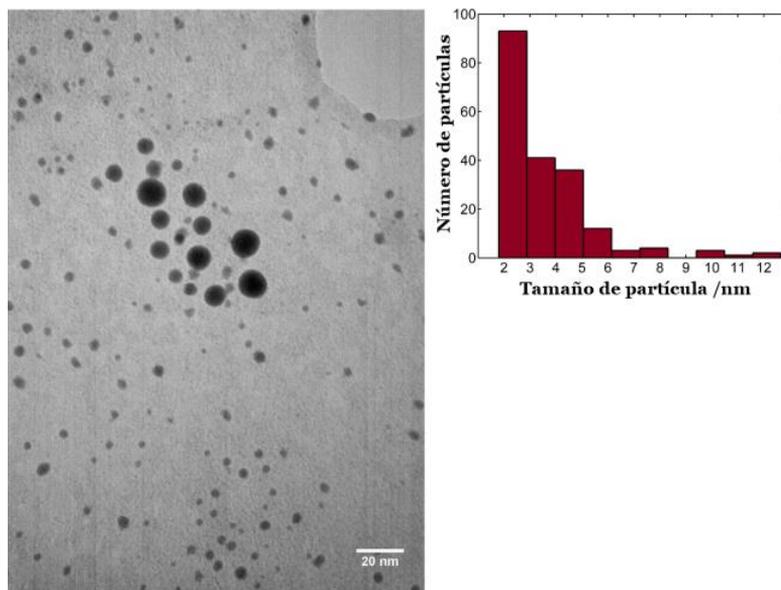
Las señales electroquímicas de la dopamina en presencia y ausencia de oro son distintas. La dopamina para el electrodo de oro es un sistema reversible, sin embargo ésta pierde reversibilidad para el electrodo de CNTs. Además la Figura 53 nos muestra el voltamperograma de la dopamina para un electrodo CNTs/PTFE/PET, presentando un pico anódico en torno a +0.65 V y el correspondiente pico catódico a +0.38 V. Para el electrodo de AuNPs/CNTs/PTFE/PET tanto el pico anódico como catódico se encuentran desplazados, centrado en torno a +0.57 V y +0.5 V

respectivamente. Esta diferencia es debida al efecto catalítico que posee el oro sobre la oxidación de la dopamina.

## 5. Microscopías electrónicas de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

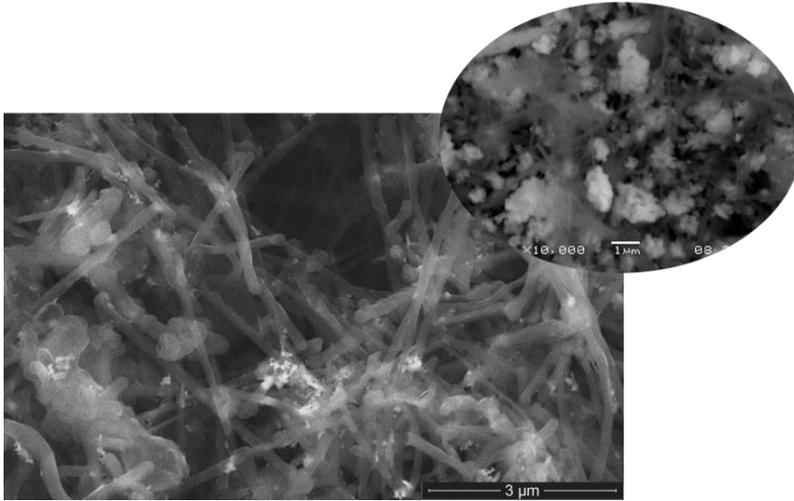
### 5.1. Nanopartículas de bismuto

Las nanopartículas de bismuto se caracterizan mediante microscopía electrónica de transmisión. La muestra de BiNPs se prepara por drop-casting sobre una rejilla de cobre para TEM.



**Figura 129. Imagen de TEM e histograma para la dispersión de nanopartículas de bismuto.**

Mediante el software ImageJ se cuantifica el tamaño de partícula y la distribución de tamaño. La Figura 129 muestra una buena dispersión de las nanopartículas. El tamaño medio de las BiNPs son  $3.6 \pm 0.3$  nm.

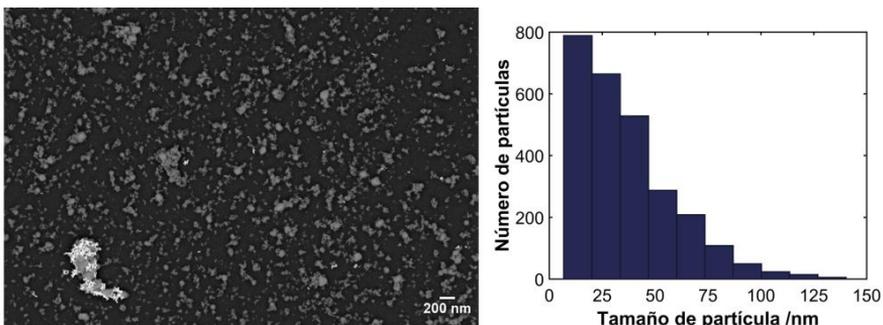


**Figura 130. SEM del electrodo de BiNPs/CNFs impregnadas a un filtro de PTFE.**

La Figura 130 muestra la micrografía de barrido electrónico para un electrodo de BiNPs/CNFs/PTFE. En la imagen se observan las nanofibras y entre ellas se aprecia el bismuto, formando un sistema compacto de nanofibras de carbono y nanopartículas de bismuto.

## 5.2. Nanopartículas de oro

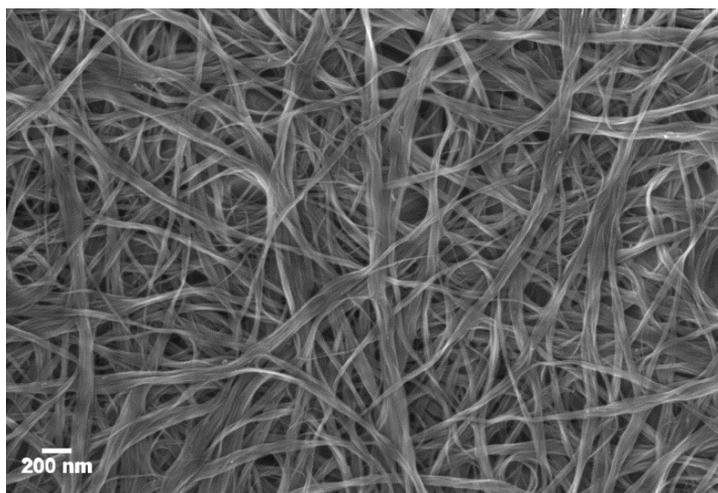
Las nanopartículas de oro se caracterizan mediante microscopía electrónica de barrido. La muestra de AuNPs se prepara por drop-casting sobre una pieza de carbono vitrificado.



**Figura 131. SEM de las nanopartículas de oro.**

Mediante el software ImageJ se cuantifica el tamaño de partícula y la distribución de tamaño. La Figura 131 muestra una buena dispersión de las nanopartículas, a pesar de la existencia de agregados de nanopartículas. El tamaño medio de las AuNPs son  $35.6 \pm 0.6$  nm.

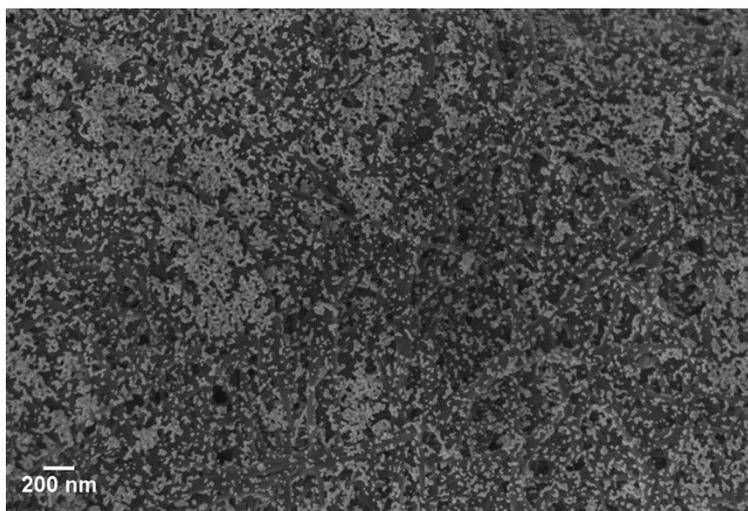
El análisis por espectroscopía de los electrodos de AuNPs/CNTs/PTFE/PET se recoge en las siguientes imágenes. En la Figura 132 se observa nanotubos de carbono impregnados sobre un filtro de teflón. Los nanotubos se encuentran bien dispersados en el disolvente empleado, 1,2-dicloroetano.



**Figura 132. SEM del electrodo de CNTs impregnados a un filtro de PTFE.**

Además, se ha calculado el diámetro de los mismos obteniendo un valor de  $59 \pm 1.8$  nm.

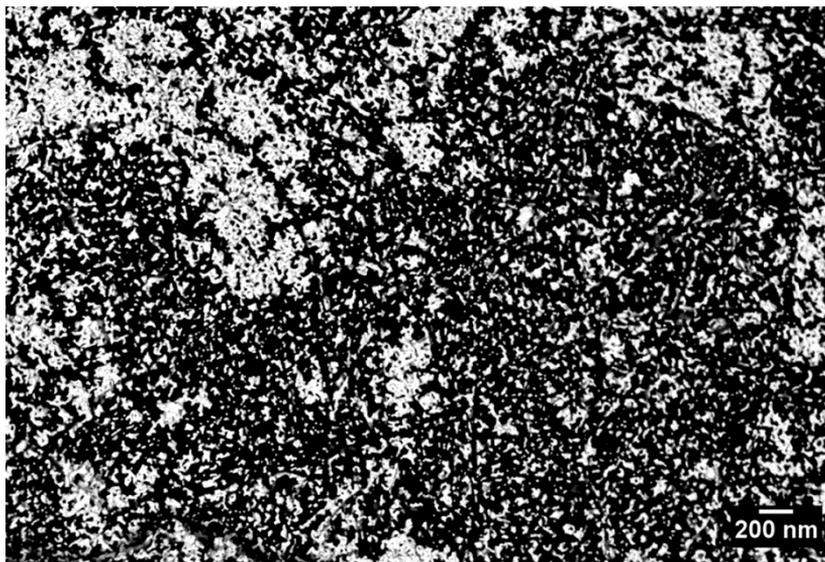
En la Figura 133 se presenta la micrografía de SEM del electrodo de AuNPs/CNTs/PTFE/PET. Se puede observar la distribución de las nanopartículas de oro por todos los nanotubos de carbono.



**Figura 133. SEM del electrodo de AuNPs/CNTs impregnado a un filtro de PTFE.**

El cálculo con ImageJ del tamaño de partícula nos permite obtener un valor medio de  $41.5 \pm 0.6 \text{ nm}$ .

La Figura 134 muestra la imagen de barrido de electrones retrodispersados (BSE) para el electrodo de AuNPs sobre CNTs impregnados en un filtro de teflón. Como se ve en la imagen predomina el color blanco y negro debido a que la técnica forma una imagen de la superficie de la muestra en la que cada elemento que la forman tiene un nivel de gris distinto. Los electrones retrodispersados proceden del haz, y son aquellos que salen despedidos de la muestra. La probabilidad de que estos electrones retrodispersados sean expulsados y alcancen el detector es directamente proporcional al peso atómico de los elementos que componen la muestra. Cuando mayor peso atómico, es mayor el número de electrones retrodispersados generando zonas más brillantes.



**Figura 134.** Micrografía SEM-BSE para el electrodo de AuNPs/CNTs/PTFE/PET.

Las zonas brillantes de la Figura 134 se corresponden con zonas con mayor peso atómico, lo que es congruente con el oro. Las zonas negras, pesos atómicos pequeños, son zonas en las que existe n estructuras de carbono.





# *Capítulo III*



En el Capítulo I se ha descrito la determinación de los parámetros adecuados para la fabricación de nuestros dispositivos y se han optimizado tanto los medios para dispersar (etanol para las CNFs y DCE para los CNTs), como el volumen a filtrar, el material del filtro, etc.

Ahora el objetivo es demostrar la viabilidad de nuestros dispositivos para determinaciones analíticas tanto de muestras sencillas como complejas. En este caso, el analito escogido es la vitamina B<sub>12</sub>, que se va a emplear para testear nuestros electrodos de CNFs/PTFE en la determinación electroanalítica de la misma.

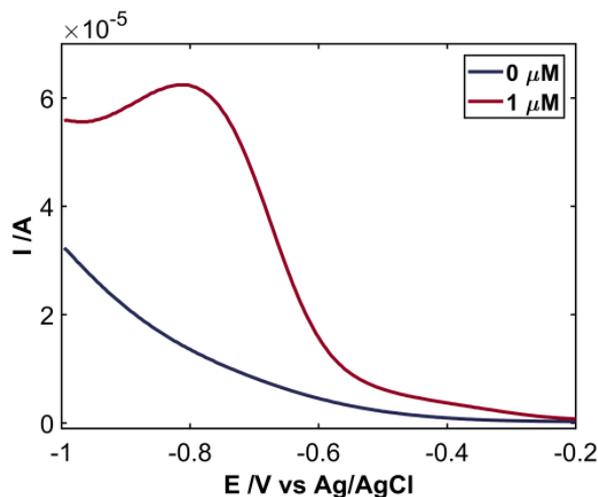
## 1. Vitamina B<sub>12</sub>

### 1.1. Primeras pruebas: CNFs vs CNTs

#### 1.1.1. Electrodos de nanofibras de carbono

Las primeras pruebas para la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> empleando un electrodo de 1 mL de CNFs/PTFE/PET muestran una clara señal electroquímica para la vitamina a concentración  $1 \cdot 10^{-6}$  M en una solución de tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a pH 5. La técnica empleada es la voltamperometría de onda cuadrada entre -1 V y -0.2 V a 15 Hz y una amplitud de pulso de 50 mV con una gota de 100  $\mu\text{L}$ .

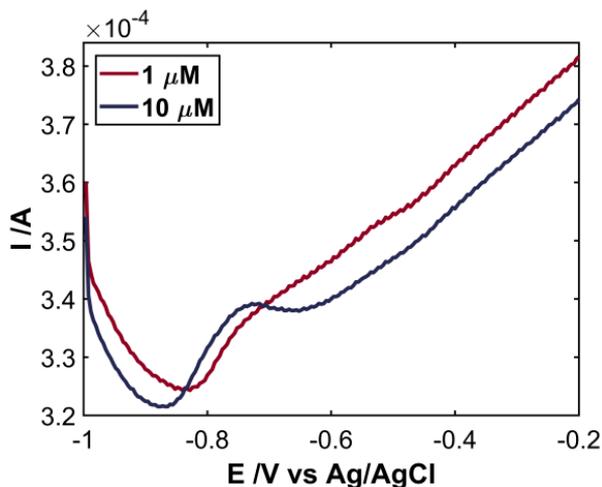
En la Figura 135 se observa pico de oxidación atribuido a la oxidación de la vitamina. Además se muestra la señal electroquímica del tampón fosfato en ausencia de vitamina B<sub>12</sub>.



**Figura 135.** Voltamperometría de onda cuadrada para una concentración  $1 \cdot 10^{-6}$  M de vitamina  $B_{12}$  en un electrodo CNFs/PTFE.

### 1.1.2. Electrodo de nanotubos de carbono

Sin embargo el empleo de un electrodo de nanotubos de carbono dispersados en SDS (filtrado 0.3 mL de CNTs) no arroja unas señales electroquímicas tan claras a la misma concentración.

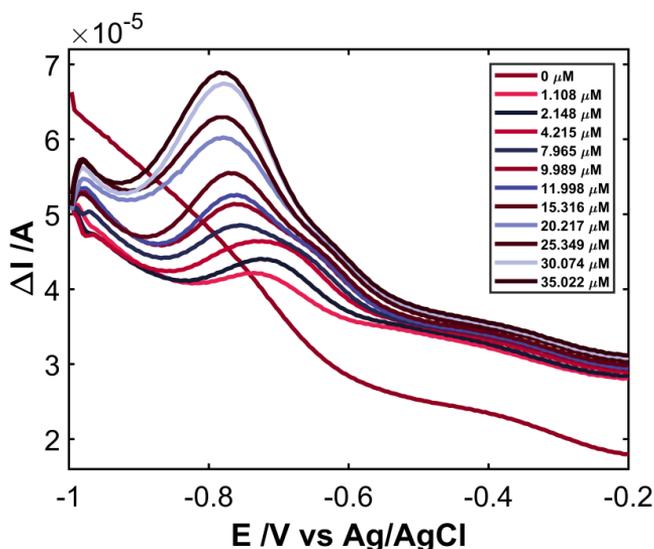


**Figura 136.** Voltamperometría de onda cuadrada para  $1 \cdot 10^{-6}$  M y  $1 \cdot 10^{-5}$  M de vitamina  $B_{12}$ .

De hecho para tener señal electroquímica de la vitamina B<sub>12</sub> como se puede apreciar en la Figura 136, la concentración ha de ser 10 veces mayor ( $1 \cdot 10^{-5}$  M).

### 1.1.3. Electrodo de bismuto

En la bibliografía podemos encontrar algún ejemplo [58] en el que se emplea un electrodo modificado con una película de bismuto para determinar vitamina B<sub>12</sub>. Para ello hemos de formar una película de bismuto sobre la superficie electroactiva, nanotubos de carbono en nuestro caso. El electrodo CNTs/PTFE/PET se sumerge en una disolución 0.2 mM de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en 1 M HCl y se aplica un potencial de -0.3 V durante 10 s bajo agitación (método ex-situ).



**Figura 137.** Voltamperometría de onda cuadrada para concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> entre 1.11 y 35.02 μM para un electrodo BiF/0.4 mL CNTs/PET.

El barrido voltamperométrico de onda cuadrada entre -1 V y -0.2 V (frecuencia 15 Hz y amplitud de pulso 0.05 V) muestra una señal electroquímica centrada en torno a -0.78 V que se corresponde con

el proceso de oxidación del centro metálico de la vitamina B<sub>12</sub>, Co(I)/Co(II).

Presenta una buena relación lineal para concentraciones entre 4.215 y 35.022  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta I = 3.976 \cdot 10^{-7} \cdot C_{B_{12}} + 6.52 \cdot 10^{-6}$ ,  $R^2 = 0.995$  y  $S_{yx} = 4.85 \cdot 10^{-5}$ .

## 2. Determinación de vitamina B<sub>12</sub>

Como se puede ver en apartados anteriores, cuanto mayor es la cantidad de nanofibras de carbono (1 mL) que impregna el filtro mejor es la señal electroquímica. Sin embargo, ocurre lo contrario con los nanotubos de carbono, cuya señal es muy buena a volúmenes relativamente bajos (0.4 mL) de CNTs.

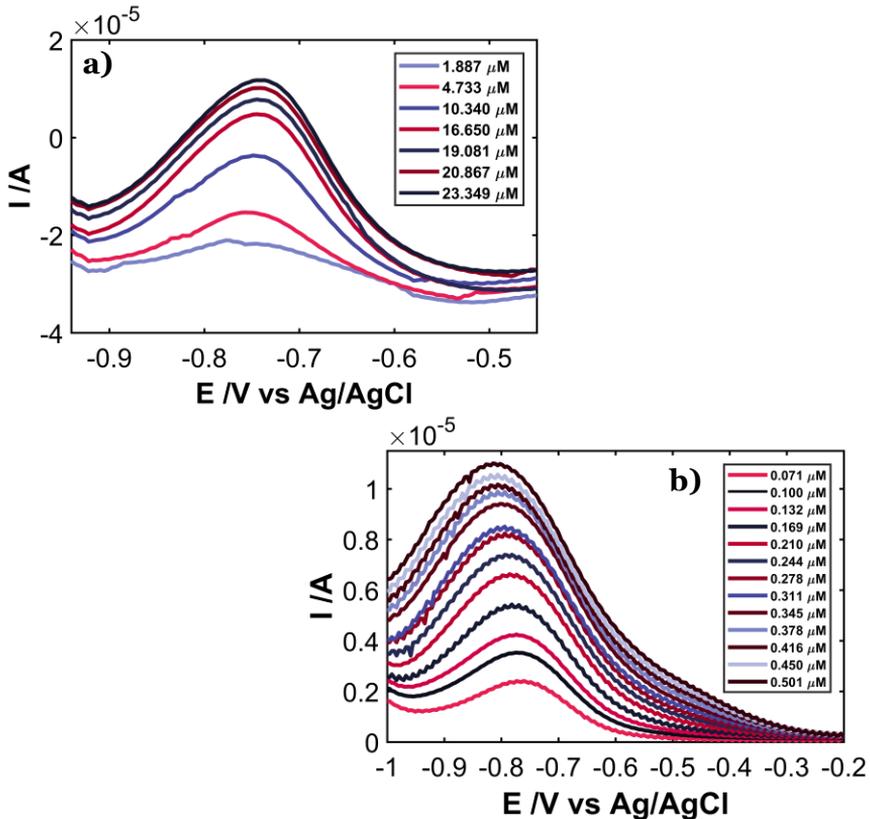
En este apartado se hará una comparativa para dos volúmenes (0.4 y 1 mL) fijos de nanofibras y nanotubos de carbono.

La técnica seleccionada es la voltamperometría de onda cuadrada usando un CH Instruments (Figura 16). Las condiciones experimentales son barrido entre -1 V y -0.2 V o -0.9 V a -0.5 V, frecuencia de 15 Hz y amplitud de pulso 50 mV. Las medidas electroquímicas se van a realizar empleando la configuración de tres electrodos sobre una celda clásica (Figura 29), en el que el electrodo de CNFs/PTFE/PET o CNT/PET es el electrodo de trabajo (WE), un hilo de platino el contraelectrodo (CE) y un electrodo no comercial de Ag/AgCl/3 M KCl como referencia (RE).

La concentración de vitamina B<sub>12</sub> varía entre 0.07 y 25.81  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a pH 5.

### 2.1. Filtros con 0.4 mL de CNFs o CNTs

El análisis voltamperométrico para ambos electrodos CNTs y CNFs nos permite obtener la Figura 138.



**Figura 138. Voltamperogramas de onda cuadrada para concentraciones entre 0.071 – 23.35  $\mu\text{M}$  de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato a pH 5. a) electrodo CNTs/PET y b) electrodo CNFs/PTFE/PET.**

Las experiencias presentan una clara correlación entre la intensidad de pico y la concentración de vitamina B<sub>12</sub> pudiendo realizar una regresión robusta eliminando los puntos anómalos. El rango de calibración para los CNTs varía entre 1.89 – 25.81  $\mu\text{M}$  de vitamina B<sub>12</sub>, siendo la relación lineal:

$$\Delta I = 1.01 \cdot 10^{-6} \cdot C_{B_{12}} + 8.11 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.998 \text{ y } S_{yx} = 4.25 \cdot 10^{-7}.$$

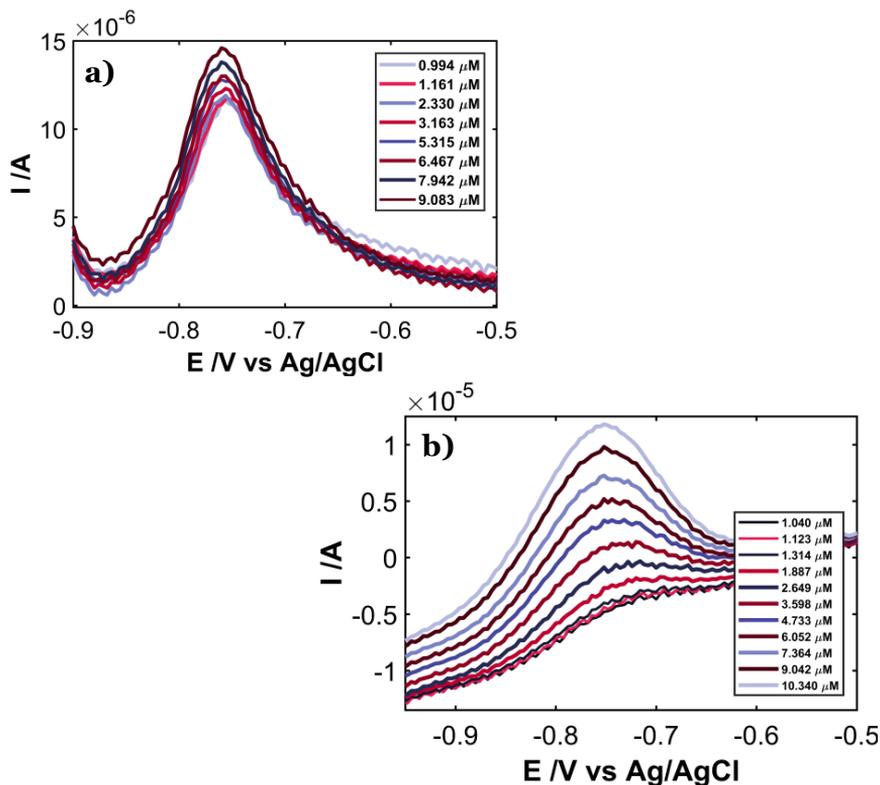
Para las CNFs el rango de concentración es un poco más bajo oscilando entre 0.07 – 0.31  $\mu\text{M}$ , con una relación lineal:

$$\Delta I = 1.08 \cdot 10^{-5} \cdot C_{B_{12}} - 1.32 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.997 \text{ y } S_{yx} = 5.32 \cdot 10^{-8}.$$

El límite de detección para los CNTs es 1.86  $\mu\text{M}$  y para las CNFs es 0.025  $\mu\text{M}$  empleando un programa de estadística para su cálculo.

## 2.2. Filtros con 1 mL de CNFs o CNTs

El análisis voltamperométrico para los electrodos con 1 mL de CNTs o CNFs nos permite obtener la Figura 139.



**Figura 139.** Voltamperogramas de onda cuadrada para concentraciones entre 0.99 – 10.34  $\mu\text{M}$  de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato a pH 5. a) electrodo CNTs/PET y b) electrodo CNFs/PTFE/PET.

El rango de calibración para los CNTs varía entre 0.99 – 9.07  $\mu\text{M}$ . Tras realizar una regresión robusta eliminando los puntos anómalos, la relación lineal es:

$$\Delta I = 4.03 \cdot 10^{-7} \cdot C_{B_{12}} + 7.21 \cdot 10^{-6}, R^2 = 0.991 \text{ y } S_{yx} = 1.22 \cdot 10^{-7}.$$

Para las CNFs el rango lineal varía entre 1.04 – 10.34  $\mu\text{M}$ , la relación lineal es:

$$\Delta I = 1.34 \cdot 10^{-6} \cdot C_{B_{12}} + 3.77 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.997 \text{ y } S_{yx} = 2.48 \cdot 10^{-7}.$$

El límite de detección para los CNTs es 1.5  $\mu\text{M}$  y las CNFs es 0.76  $\mu\text{M}$ .

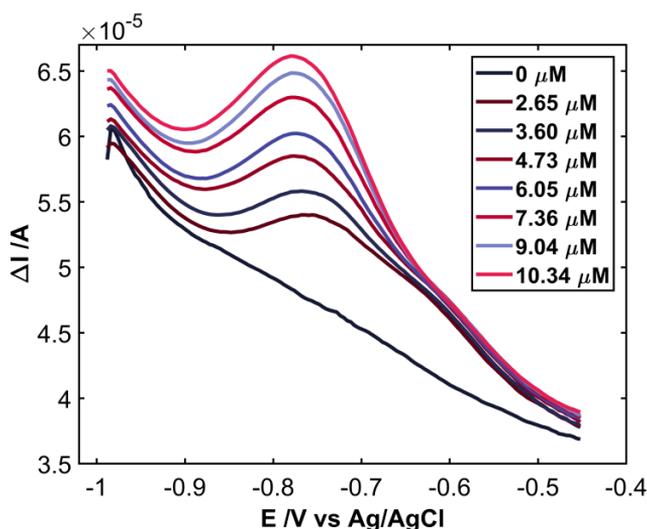
Los mejores resultados obtenidos son para los dos tipos de electrodos de CNFs. En los dos casos se obtuvo un rango de concentración lineal más amplio en comparación de los CNTs. En el caso de los electrodos de CNTs, el electrodo impregnado con 0.4 mL no es capaz de detectar concentraciones inferiores a 1.8  $\mu\text{M}$  de vitamina B<sub>12</sub>.

Viendo los resultados obtenidos para los dos volúmenes de CNFs y CNTs, el electrodo de nanofibras de carbono es que permite obtener mejores resultados. El electrodo de 1 mL CNFs/PTFE/PET es el escogido para las siguientes determinaciones.

### **3. Determinación de vitamina B<sub>12</sub> con electrodos de CNFs**

La técnica electroquímica seleccionada para llevar a cabo su determinación es la voltamperometría de onda cuadrada (SWV). La oxidación de la vitamina B<sub>12</sub> se estudia en una solución de tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a pH 5. Los parámetros

seleccionados son un barrido entre -1 V y -0.45 V con una frecuencia de 15 Hz y una amplitud de pulso de 50 mV. La concentración de vitamina B<sub>12</sub> varía entre una concentración de  $4.2 \cdot 10^{-7}$  M y  $1.0 \cdot 10^{-5}$  M. El electrodo de trabajo es un electrodo de 1 mL de CNFs impregnadas en un filtro de teflón (CNFs/PTFE/PET).



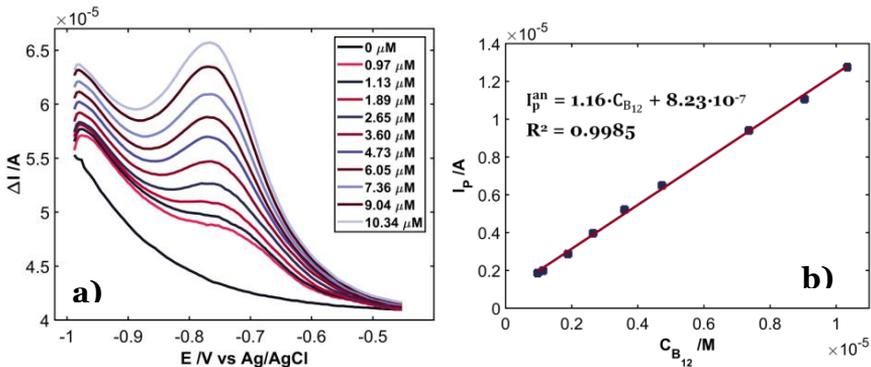
**Figura 140.** Voltamperogramas de onda cuadrada para una disolución de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato (pH = 5). La concentración de vitamina B<sub>12</sub> varía entre  $4.2 \cdot 10^{-7}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M.

La Figura 140 muestra las experiencias a diferentes concentraciones de vitamina B<sub>12</sub> llevadas a cabo por voltamperometría de onda cuadrada incluyendo la señal electroquímica correspondiente al tampón fosfato en ausencia de vitamina. El pico de oxidación centrado en torno a -0.78 V se atribuye al proceso de oxidación del núcleo central de la vitamina B<sub>12</sub>, Co(I)/Co(II). Las experiencias presentan una clara correlación entre la intensidad de pico y la concentración de vitamina B<sub>12</sub> pudiendo realizar una regresión robusta eliminando los puntos anómalos. La relación lineal obtenida:

$$\Delta I = 0.97 \cdot C_{B_{12}} + 3.06 \cdot 10^{-6}, R^2 = 0.998 \text{ y } S_{yx} = 1.53 \cdot 10^{-7}.$$

El rango es lineal para una concentración de vitamina B<sub>12</sub> entre  $0.97 \cdot 10^{-6}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M, como se ve en la Figura 140. El límite de detección es de  $4.5 \cdot 10^{-7}$  M para la regresión robusta:

$$\Delta I = 1.16 \cdot C_{B_{12}} + 8.23 \cdot 10^{-7}, R^2 = 0.9985 \text{ y } S_{yx} = 1.69 \cdot 10^{-7}.$$



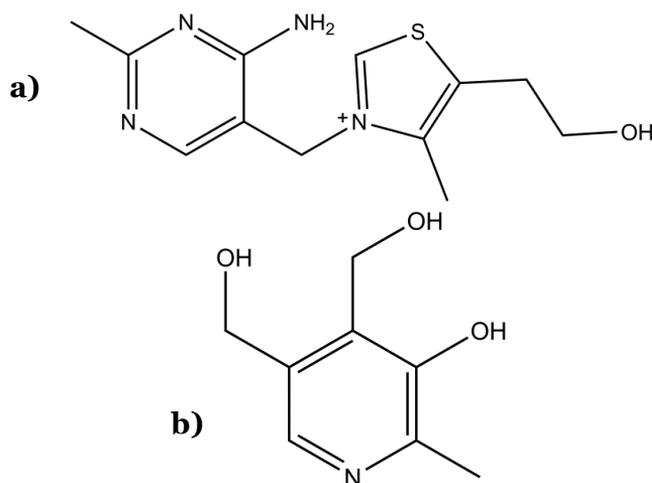
**Figura 141. a) Voltamperogramas de onda cuadrada para concentraciones crecientes de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato a pH 5. b) Calibrado Intensidad de pico vs concentración de vitamina B<sub>12</sub>.**

Los electrodos habituales en la literatura para la determinación de vitamina B<sub>12</sub> es el electrodo de carbono vitrificado. Sin embargo, hay evidencias de que el producto de oxidación de la vitamina B<sub>12</sub> se adsorbe sobre la superficie electródica. Para demostrarlo se llevan a cabo unas experiencias empleando ambos electrodos, GCE y CNFs/PTFE. La limpieza de la superficie se puede realizar tanto por procedimientos físicos como químicos con el fin de recuperar la superficie original antes de posteriores experimentos, escogiendo en nuestro caso la limpieza electroquímica debido a su simplicidad. Por voltamperometría de onda cuadrada se determina una concentración de  $9.73 \cdot 10^{-6}$  M de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato para posteriormente realizar su limpieza. La limpieza electroquímica se lleva a cabo barriendo entre -1.0 V y -0.2 V a 15 Hz. Tras 9 barridos consecutivos el electrodo de CNFs/PTFE se ha

recuperado casi en su totalidad, habiendo disminuido la intensidad del pico correspondiente a la señal del analito en más del 95%. Sin embargo tras el mismo número de barridos la intensidad de la señal del analito para el GCE solo ha disminuido en un 55%, alcanzando una disminución del 80% tras 90 barridos consecutivos.

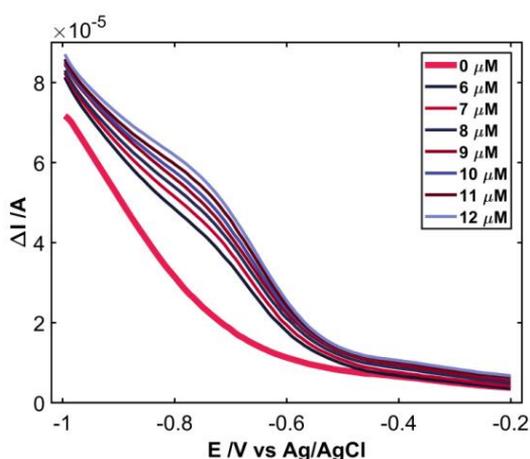
## 4. Determinación de vitamina B<sub>12</sub> en muestras complejas

Debido al buen comportamiento del electrodo de CNFs/PTFE se va a utilizar para determinar un complejo vitamínico con vitamina B<sub>12</sub>. En los productos comerciales la vitamina B<sub>12</sub> se encuentra en concentraciones bajas, sin embargo el resto de compuestos como la vitamina B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> se encuentran en concentraciones muy superiores, por lo que la vitamina B<sub>12</sub> sufre una gran interferencia por parte de estos compuestos. Esta mezcla compleja consta de vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> en tampón fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a pH 5.



**Figura 142. Estructura química de la vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina) y vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina).**

Se emplea el método de la adición estándar en el que las concentraciones de vitamina B<sub>1</sub> ( $3.2 \cdot 10^{-6}$  M) y vitamina B<sub>6</sub> ( $5.3 \cdot 10^{-3}$  M) se mantienen fijas mientras que la de vitamina B<sub>12</sub> varía entre  $6 \cdot 10^{-6}$  M y  $1.2 \cdot 10^{-5}$  M para comprobar la viabilidad en la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> en muestras complejas. Para ello se emplea la técnica SWV barriendo entre -1.0 V y -0.2 V con una frecuencia de 15 Hz y una amplitud de pulso de 50 mV. El electrodo de trabajo es un electrodo 1 mL CNFs/PTFE/PET.

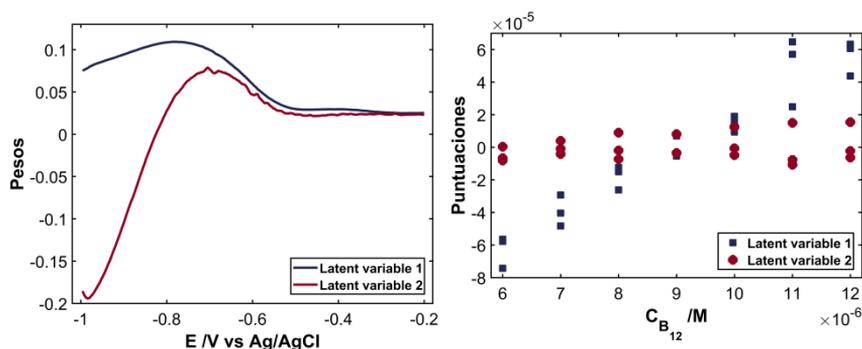


**Figura 143.** Voltamperogramas de onda cuadrada para concentraciones crecientes de vitamina B<sub>12</sub> en tampón fosfato a pH 5 en presencia de vitamina B<sub>1</sub>  $3.2 \cdot 10^{-3}$  M y vitamina B<sub>6</sub>  $5.3 \cdot 10^{-3}$  M.

En la Figura 143 se ve la contribución de la matriz compuesta por vitamina B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> (línea rosa, ausencia de vitamina B<sub>12</sub>) en tampón fosfato a pH 5, que presenta una gran intensidad de oxidación. Este fondo afecta notablemente a la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> indicando la gran interferencia que sufre la vitamina B<sub>12</sub> por parte de las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub>. Por ello, se recurre a técnicas de análisis multivariante para cuantificar la respuesta de la vitamina B<sub>12</sub> en esta mezcla compleja.

El análisis multivariante se define como el conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente conjuntos de datos multivariantes cuando hay varias variables medidas para cada caso. Las técnicas multivariantes se clasifican en tres grupos: métodos de dependencia, de interdependencia y estructurales. Los métodos de dependencia buscan establecer si las variables independientes afectan a las variables dependientes. Los métodos de interdependencia buscan identificar que variables están relacionadas y los estructurales analizan como afectan las variables independientes a las variables dependientes y como se relacionan entre sí.

Teniendo todo esto en cuenta, se realiza una regresión multivariante (incluido en las métodos de dependencia) por mínimos cuadrados parciales (PLSR).

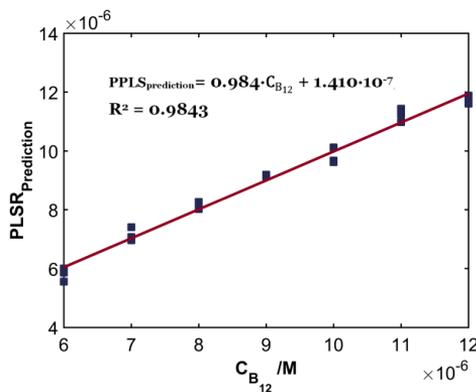


**Figura 144. Deconvolución de la matriz de datos tras un análisis multivariante: a) Pesos vs potencial y b) Puntuaciones vs concentración de vitamina B<sub>12</sub> para las dos primeras variables latentes.**

Cada concentración de vitamina B<sub>12</sub> se analiza por triplicado, por lo que se va a trabajar con 27 variables dependientes. El número de potenciales predichos es 200 que se corresponden con el número de potenciales medidos para cada experiencia voltamperométrica.

En la Figura 144 se representa la deconvolución de los datos obtenidos en la mezcla de vitaminas para pesos frente a potencial y puntuaciones frente a concentración de vitamina B<sub>12</sub>. En los pesos, la primera variable latente parece estar relacionada con la vitamina B<sub>12</sub> debido a que la intensidad de pico a -0.78 V es muy similar a aquellos obtenidos para muestras de vitamina B<sub>12</sub> puras (ver Figura 140 y Figura 141). En cuanto a las puntuaciones, la primera variable latente está relacionada con la vitamina B<sub>12</sub> porque en su representación *vs* C<sub>B<sub>12</sub></sub> se ve un crecimiento lineal a medida que aumenta su concentración.

La segunda variable latente está relacionada con el fondo provocado por las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> debido a que no existe correlación alguna con la vitamina B<sub>12</sub>. El modelo de regresión correspondiente a esta primera variable latente no proporciona ni buenos parámetros de regresión ni buenas predicciones precisamente debido a la gran contribución de fondo de la matriz. Es por ello que se debe tener en cuenta para poder llevar a cabo una correcta cuantificación de la vitamina B<sub>12</sub>. El modelo que se va a construir incluye ambas variables latentes ya que ambas contribuyen a la señal electroquímica.



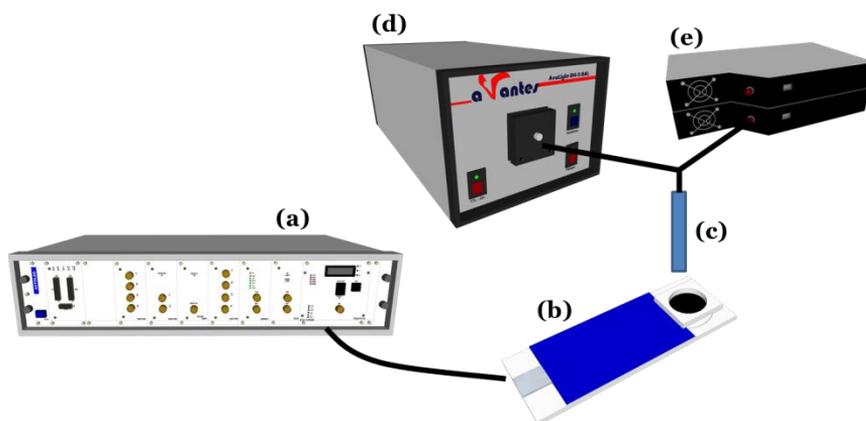
**Figura 145. Modelo para la vitamina B<sub>12</sub> generado a partir de las dos variables latentes principales.**

Se determina la concentración de una muestra problema de vitamina B<sub>12</sub>, con un valor estimado de  $9 \cdot 10^{-6}$  M siendo su intervalo de confianza  $[8.76 \pm 0.64] \cdot 10^{-6}$  M y su RSD = 2.8%.

## 5. Medidas espectroelectroquímicas

En la bibliografía se puede encontrar información espectroscópica sobre la vitamina B<sub>12</sub>. [292], [293]. Las disoluciones acuosas de esta vitamina presenta un máximo de absorción a tres longitudes de onda: 278, 360 y 550 nm.

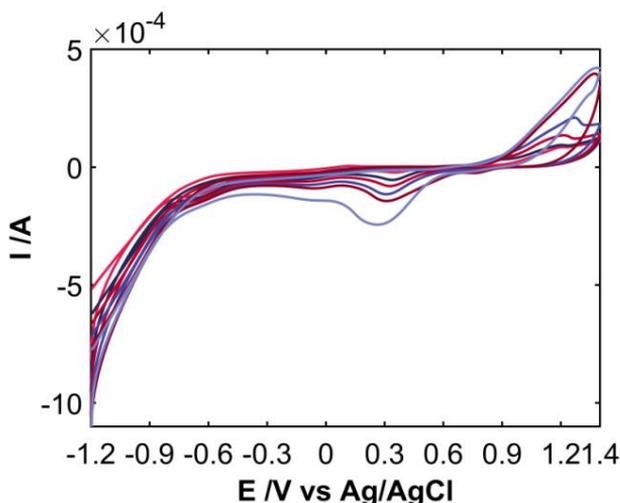
Las medidas espectroelectroquímicas se llevan a cabo empleando la misma configuración descrita en la Figura 114. El potencióstato/galvanostato empleado es un Autolab PGSTAT 20, la lámpara proporciona luz halógena y de deuterio.



**Figura 146. Configuración de los equipos para medidas espectroelectroquímicas. A) Potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT 20, b) electrodo de trabajo, c) sonda, d) lámpara y e) detector.**

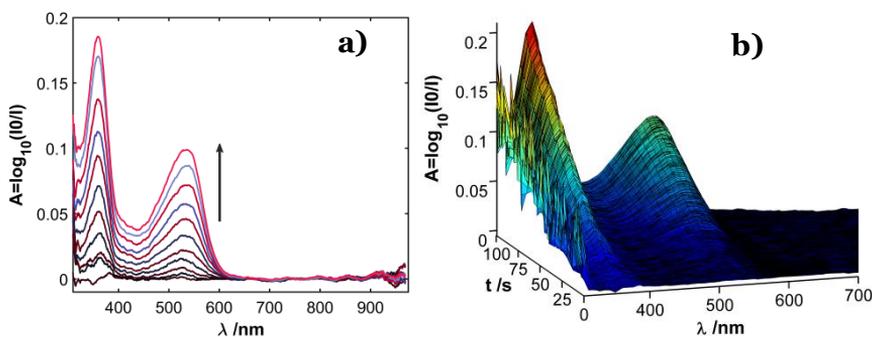
Mediante una celda de gota (Figura 15) y colocando una sonda lo más próximo posible a la superficie electródica se lleva a cabo una voltamperometría cíclica entre -1.2 V y +1.4 V a una velocidad de

barrido de 0.05 V/s. La concentración de vitamina B<sub>12</sub> es 1·10<sup>-3</sup> M en tampón hidrogenoftalato de potasio (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>) a pH 3.



**Figura 147. Voltamperometría cíclica para vitamina B<sub>12</sub> en tampón hidrogenoftalato de potasio.**

En la Figura 147 se puede ver una señal electroquímica en torno a +0.28 V que se atribuye al proceso Co(II)/Co(III).



**Figura 148. Señales espectroelectroquímicas obtenidas para vitamina B<sub>12</sub> 1 mM en tampón hidrogenoftalato de potasio a pH 3 para un voltamperometría cíclica. a) Espectro UV-Vis, b) Representación 3D absorbancia vs potencial/tiempo.**

La Figura 148a muestra la señal espectral de la vitamina, en el que las bandas principales centradas a 360 nm y 543 nm crecen a medida que el barrido de potencial evoluciona. La Figura 148b

muestra los cambios espectrales en 3D, mostrando lo mismo que en la Figura 148a, las bandas a 360 y 543 nm crecen durante ambos barridos.

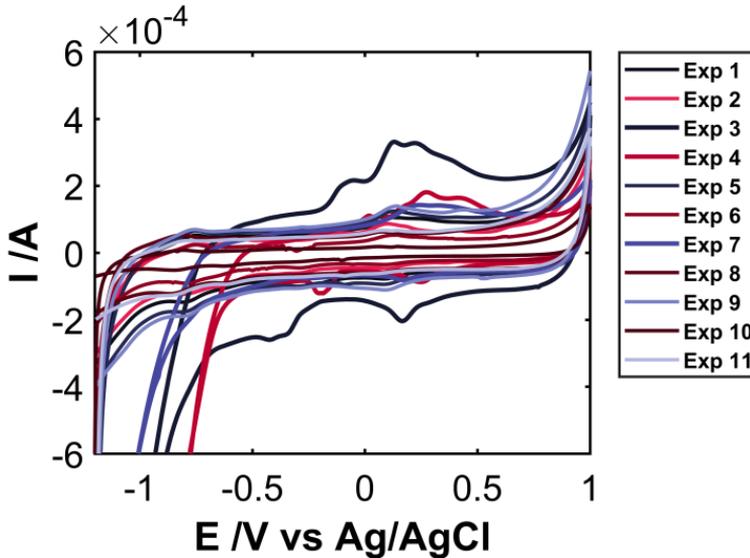
## 6. Influencia del pH sobre la vitamina B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> es un compuesto altamente influenciado por el pH del medio. A pHs extremos, pH 1 y pH 13, las vitaminas son inestables. Con el fin de comprobar esta influencia se realiza un diseño de experimentos central compuesto estrella 2<sup>2</sup>. Los valores a optimizar son el volumen de CNTs filtrado, V<sub>CNTs</sub> y el pH del tampón hidrogenofalato de potasio. En total se obtienen 11 experiencias en el que la señal electroquímica (intensidad de pico) de la vitamina B<sub>12</sub>, I<sub>pB12</sub> (A), se tomará como variable respuesta del diseño.

**Tabla 26. Diseño de experimentos central compuesto 2<sup>2</sup> + 3 réplicas en el punto central.**

Experimento	Diseño	
	V <sub>CNTs</sub> , mL	pH
1	0.9	5.55
2	0.9	5.55
3	1.32	2.4
4	0.9	1.09523
5	0.9	5.55
6	0.30603	5.55
7	0.48	2.4
8	0.9	10.0048
9	1.49397	5.55
10	0.48	8.7
11	1.32	8.7

Tras medir los electrodos de CNTs/PTFE/PET a una concentración de vitamina B<sub>12</sub> fija de  $3.5 \cdot 10^{-4}$  M a los distintos pH. Los voltamperogramas (barrido entre -1.2 V y +1 V) obtenidos se recogen en la Figura 149.



**Figura 149. Señal electroquímica de la vitamina B<sub>12</sub> obtenida en el diseño de experimentos.**

Los voltamperogramas muestran tres experiencias; exp 3, exp 4 y exp 7, con un comportamiento anómalo en comparación al resto. Estas experiencias se corresponden a  $V_{\text{CNTs}}$  1.32 mL y pH 2.4;  $V_{\text{CNTs}}$  0.9 mL y pH 1.09523 y  $V_{\text{CNTs}}$  0.48 mL y pH 2.4. En los tres casos el pH es inferior a 3 en los cuales la vitamina B<sub>12</sub> es inestable. A medida que aumenta el pH del medio la señal electroquímica de la vitamina B<sub>12</sub> va disminuyendo.

El resto de señales electroquímicas muestran los dos picos para la vitamina B<sub>12</sub>, el del par Co(I)/Co(II) y el del Co(II)/Co(III). Las señales de ambos picos anódicos se emplearán para el análisis del diseño.

### 6.1. Análisis para el pico anódico Co(II)/Co(III)

Los valores se introducen en el software Statgraphics y se analiza el diseño de experimentos, para tratar de explicar el comportamiento de la variable respuesta (intensidad de pico) debido a la influencia de los factores. Se lleva cabo un análisis de la varianza, Tabla 27 para estudiar simultáneamente el efecto de los factores. En este caso hay 2 efectos, pH y  $V_{CNTs}$ , que tienen un valor-p menor de 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero a un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 27. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup> con los datos de la Tabla 27.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Volumen	1.11E-9	1	1.1E-9	9.29	0.029
B:pH	1.9E-9	1	1.97E-9	16.47	0.009
AA	3.19E-11	1	3.19E-11	0.27	0.628
AB	6.81E-10	1	6.81E-10	5.68	0.063
BB	3.89E-10	1	3.89E-10	3.25	0.131
Error total	5.99E-10	5	1.20E-10		
Total (corr.)	4.76E-9	10			

$R^2 = 87.4$  por ciento.

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 74.8 por ciento.

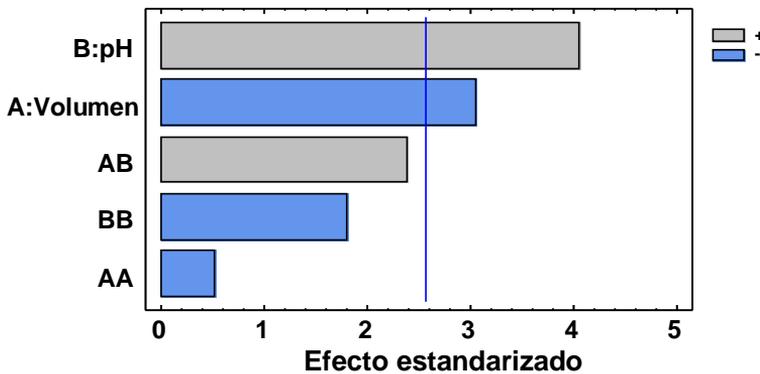
El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado, explica el 87.4% de la variabilidad en  $I_p$ . El estadístico  $R^2$  ajustado, que es el más adecuado para comparar modelos cuando tienen el número de variables independientes diferente, es 74.8%.

**Tabla 28. Efectos estimados para  $I_p^{an}$  (A).**

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	-1.32E-05	6.32E-06	
A:Volumen	-2.36E-05	7.74E-06	1.0
B:pH	3.14E-05	7.74E-06	1.0
AA	-4.75E-06	9.21E-06	1.095
AB	2.61E-05	1.09E-05	1.0
BB	-1.66E-05	9.21E-06	1.095

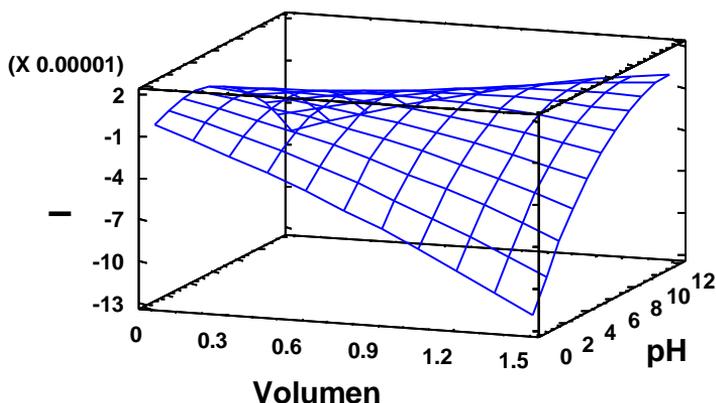
La Tabla 28 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. El factor de inflación de varianza (VIF) más grande, es igual a 1.095. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los VIF serían igual a 1.

En el diagrama de Pareto podemos ver que hay una gran influencia del pH.



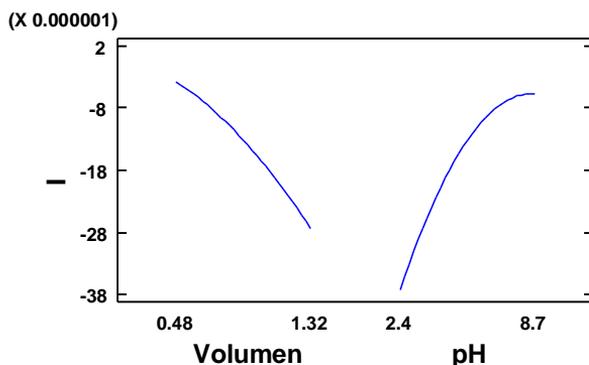
**Figura 150. Diagrama de Pareto.**

La Figura 151 muestra la superficie de respuesta estimada, e indica que se obtiene mejor respuesta para volúmenes de CNTs,  $V_{CNTs}$ , mayores y para pH neutros o ácidos.



**Figura 151. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

La Figura 152 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos. Se observa que la intensidad de pico aumenta a medida que disminuye el pH. Con respecto al volumen de CNTs se aprecia un aumento en la intensidad de pico a medida que aumenta el volumen de CNTs.



**Figura 152. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

El programa puede proporcionar unos valores “óptimos” combinando los niveles de los factores y maximizando  $I_p$  sobre una región determinada. Estos valores óptimos son:

$$V_{\text{CNTs}} = 0.30603 \text{ mL y } \text{pH} = 5.02988$$

### 6.2. Análisis para el pico anódico Co(I)/Co(II)

Los valores se introducen en el software Statgraphics y se analiza el diseño de experimentos. El Anova, Tabla 29, muestra que el valor-p para los factores es mayor de 0.05. Sin embargo, hay dos interacciones, el volumen con el pH y el pH consigo mismo con un valor-p menor de 0.05 por lo que son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95%.

**Tabla 29. ANOVA del diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Volumen	6.78E-11	1	6.78E-11	2.69	0.162
B:pH	4.88E-12	1	4.88E-12	0.19	0.678
AA	3.48E-11	1	3.48E-11	1.38	0.293
AB	2.11E-10	1	2.11E-10	8.36	0.034
BB	2.68E-10	1	2.68E-10	10.63	0.022
Error total	1.26E-10	5	2.52E-11		
Total (corr.)	8.04E-10	10			

$R^2 = 84.3$  por ciento.

$R^2$  (ajustada por g.l.) = 68.6 por ciento.

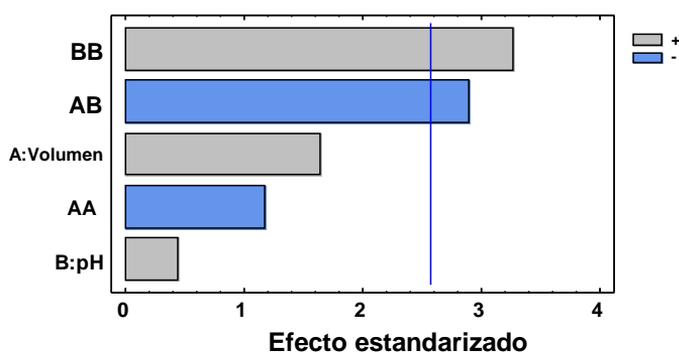
El estadístico  $R^2$  indica que el modelo, así ajustado, explica el 84.3% de la variabilidad en  $I_p$ .

**Tabla 30. Efectos estimados para  $I_p$  (A).**

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	-1.48E-05	2.90E-06	
A:Volumen	5.82E-06	3.55E-06	1.0
B:pH	1.56E-06	3.55E-06	1.0
AA	-4.97E-06	4.23E-06	1.095
AB	-1.45E-05	5.02E-06	1.0
BB	1.38E-05	4.23E-06	1.095

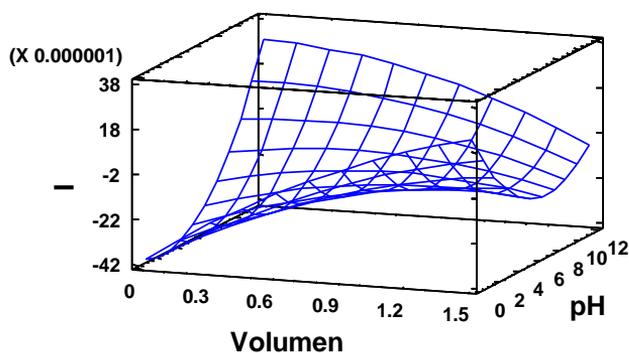
La Tabla 30 muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. El factor de inflación de varianza (VIF) más grande, es igual a 1.095. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los VIF serían igual a 1.

En el diagrama de Pareto podemos ver que hay una gran influencia de la interacción del pH consigo misma y de este con el  $V_{CNTs}$ .



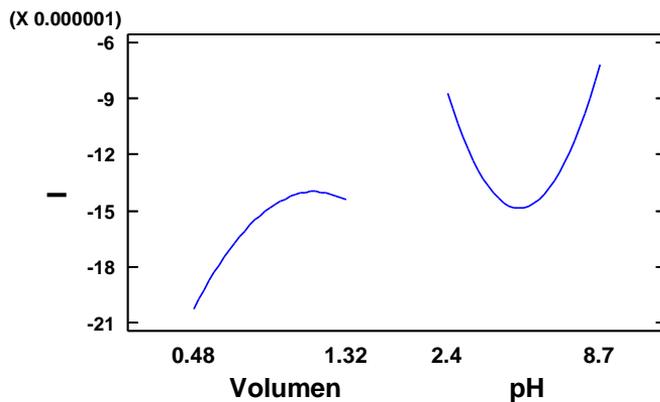
**Figura 153. Diagrama de Pareto.**

La Figura 154 muestra la superficie de respuesta estimada, e indica que se obtiene mejor respuesta para pH y el volumen de CNTs. Presentando una tendencia a pH básicos y poco volumen de CNTs.



**Figura 154. Superficie de respuesta tridimensional para el diseño central compuesto  $2^2$ .**

La Figura 155 muestra los principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos. Para el factor volumen de CNTs se observa que una disminución en el valor permite obtener intensidades de pico mayores. El pH presenta un comportamiento no lineal, comportamiento que es significativo ya que la interacción pH-pH es significativa. Como se aprecia en la figura, a medida que aumenta el pH se produce un aumento de la  $I_p$ , sin embargo, hay un punto en el que dicho aumento del pH conlleva un cambio en el comportamiento de la variable respuesta, la cual comienza a disminuir de drásticamente.



**Figura 155. Principales efectos de las variables influyentes en el proceso de diseño de los electrodos de diseño de experimentos.**

El programa puede proporcionar unos valores “óptimos” combinando los niveles de los factores y maximizando  $I_p$  sobre una región determinada. Estos valores óptimos son:

$$V_{\text{CNTs}} = 1.49397 \text{ mL y } \text{pH} = 1.09523$$

Este valor óptimo de pH está influenciado por esas 3 experiencias del diseño de experimentos a pH muy ácidos, ya que la contribución de la intensidad de los picos Co(I)/Co(II) es muy grande.

Sin embargo para el par Co(II)/Co(III) el valor de pH “óptimo” obtenido está de acuerdo con el pH escogido para llevar a cabo la determinación de vitamina B<sub>12</sub>.



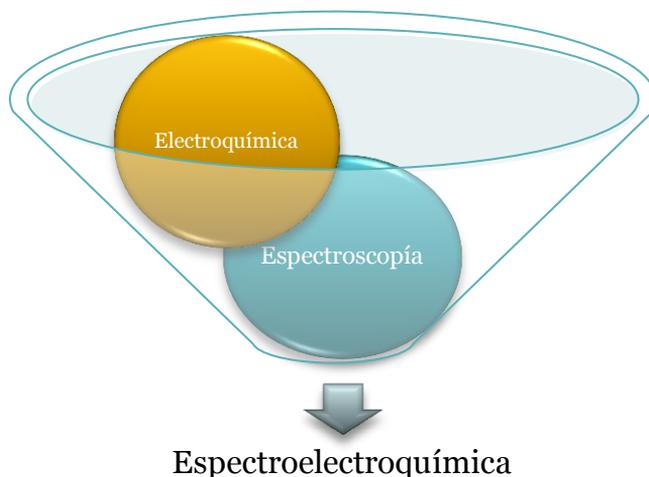


# *Capítulo IV*



## 1. Determinación de colorantes

La espectroelectroquímica es una técnica relativamente reciente que combina lo mejor de dos técnicas analíticas: la electroquímica y la espectroscopía.

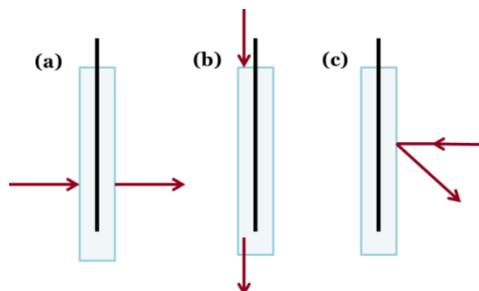


**Figura 156. Espectroelectroquímica**

La electroquímica puede aportar información tanto termodinámica como cinética del proceso químico por transferencia de un electrón. Sin embargo, no es capaz de identificar cuando otra especie que se está generando interfiere en la medida física. Aquí es donde la combinación de ambas técnicas puede arrojar luz a un problema que empleando las técnicas por separado no seríamos capaces de resolver, ya que se podría elucidar el mecanismo de transferencia electrónica [294].

Existen varias configuraciones ópticas en celdas electroquímicas:

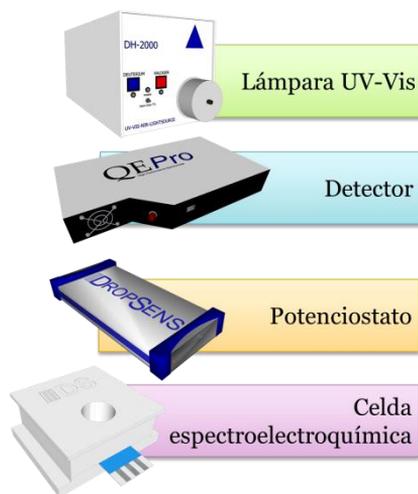
- ✓ Transmisión. La única consideración que hay que tener en cuenta es que el electrodo debe ser ópticamente transparente.
- ✓ Reflexión.



**Figura 157. Configuraciones ópticas posibles para técnicas de espectroelectroquímica. (a) Transmisión normal; (b) Transmisión en paralelo; (c) Reflexión.**

Es por ello, que esta técnica se va emplear para la determinación de muestras de colorantes ya que presentan tanto señal electroquímica como espectral, con longitudes de onda características para cada colorante.

El instrumental empleado para llevar a cabo estas experiencias es:



**Figura 158. Instrumental empleado para la realización de experiencias de espectroelectroquímica.**

Además para registrar el espectro de UV-Vis de los colorantes se empleará un espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240, que registre el espectro entre 200 – 800 nm. Las cubetas empleadas en el análisis son de cuarzo con una ventana óptica de 10 mm (Hellma Analytics, 100-QS). De esta manera seremos capaces de identificar las longitudes de onda características de cada colorante y con ello poder discernir su espectro UV-Vis por espectroelectroquímica bien ellos solos o en mezclas.



**Figura 159. Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UVmini-1240.**

Las experiencias espectroelectroquímicas se llevan a cabo empleando electrodos serigrafados comerciales de carbono (DRP-110, Dropsens). Así mismo la celda empleada en las experiencias es una celda de reflexión (RProbe-Vis-UV, Dropsens) especial para los electrodos comerciales y para llevar a cabo experiencias espectroelectroquímicas.

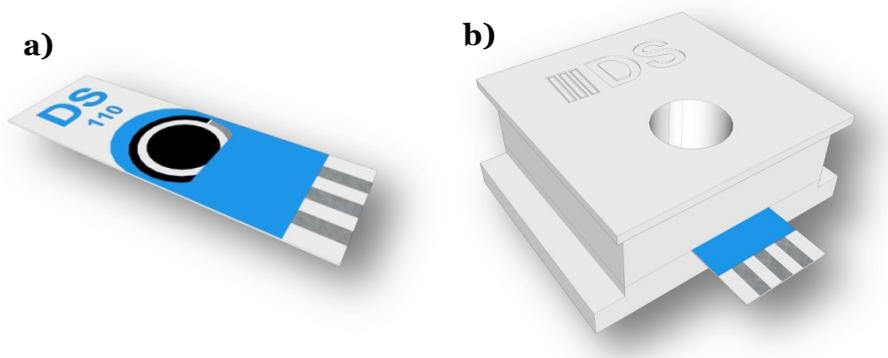


Figura 160. A) Electrodo serigrafiado de carbono y b) celda espectroelectroquímica de reflexión.

## 2. Determinación de amarillo ocaso FCF

### 2.1. Electrodo de carbono comercial

La estructura química del amarillo ocaso FCF o E-110 se recoge en la Figura 6. El espectro UV-Vis característico de este colorante se mide gracias a un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 159).

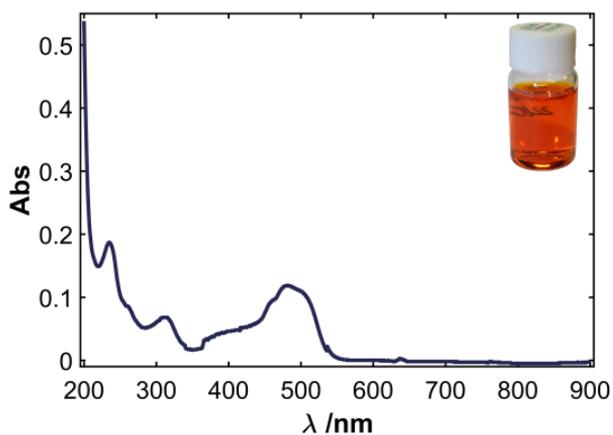
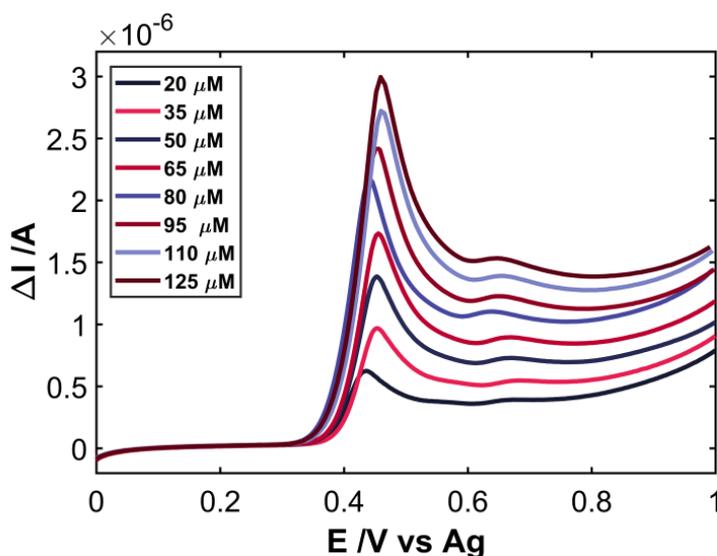


Figura 161. Espectro UV-Vis amarillo ocaso FCF o E-110.

Como se observa el amarillo ocaso FCF presenta tres bandas, una principal y dos de menor intensidad centradas en torno a 235 nm,

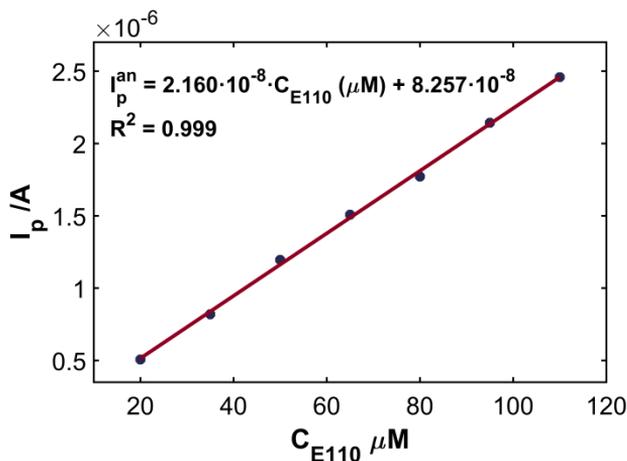
312 y 482 nm. Esta última será la que se emplee para su determinación por espectroelectroquímica.

Al igual que para la azorrubina, el valor mínimo de concentración del calibrado será el mínimo que el detector puede determinar. Las concentraciones de amarillo ocaso varían en el rango entre 20 -125  $\mu\text{M}$  de E-110 en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) a pH 6. Los parámetros de la experiencia voltamperométrica son: velocidad de barrido  $0.01 \text{ V s}^{-1}$  entre +0 V y +1 V.



**Figura 162. Voltamperometría lineal a concentraciones crecientes de amarillo ocaso FCF (20 - 125  $\mu\text{M}$ ) para un electrodo de carbono comercial.**

Los voltamperogramas obtenidos durante la experiencia espectroelectroquímica del amarillo ocaso presentan una buena relación lineal entre la intensidad de pico (centrado en torno a +0.48 V) y la concentración de E-110.



**Figura 163. Regresión lineal robusta para el pico anódico.**

Tras llevar un análisis robusto por regresión por mínimos cuadrados (LMS), se obtiene:

$$\Delta I (A) = 2.16 \cdot 10^{-8} \cdot C_{E-110} (\mu M) + 8.26 \cdot 10^{-8}.$$

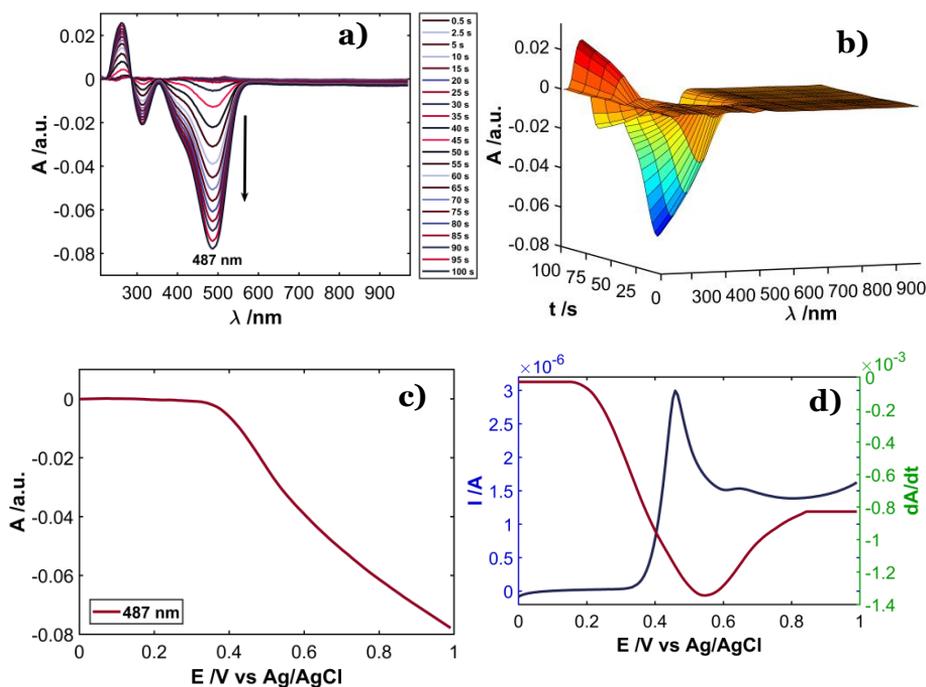
El coeficiente de determinación y el error estándar residual son  $R^2 = 0.999$  y  $S_{yx} = 2.85 \cdot 10^{-8}$ . Además se calcula el límite de detección con el modelo lineal obteniendo un valor de  $7.01 \mu M$  de E-110.

Con estos resultados se analiza la reproducibilidad del método empleando las pendientes de 3 calibrados diferentes obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La media de las pendientes  $2.11 \cdot 10^{-8} \pm 9.24 \cdot 10^{-10} \cdot A \cdot \mu M^{-1}$  y la desviación estándar relativa  $\%RSD = 2.39\%$ ,  $n=3$  indican que estos electrodos muestran una buena reproducibilidad.

Además, el empleo de este analito nos permite utilizar técnicas electroquímicas debido a que el amarillo ocaso presenta tres bandas en el UV-Vis.

Para este propósito simultáneamente a la realización de la voltamperometría lineal se recoge el espectro UV-Vis colocando la sonda cerca de la superficie electródica para una concentración 125  $\mu\text{M}$  de E-110.

La Figura 164a muestra la señal espectral UV-Vis del amarillo ocaso FCF, en el que la banda principal centrada a 487 nm decrece a medida que la experiencia evoluciona. La Figura 164b muestra los cambios espectrales en 3D, mostrando lo mismo que en la Figura 164a, la banda a 487 nm decrece durante el barrido.



**Figura 164. Señales espectroelectroquímicas obtenidas para amarillo ocaso 125  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) para un voltamperometría lineal. a) Espectro UV-Vis, b) Representación 3D absorbancia vs potencial/tiempo, c) Voltabsorciograma a 487 nm y d) derivada del voltabsorciograma a 487 nm y voltamperograma lineal.**

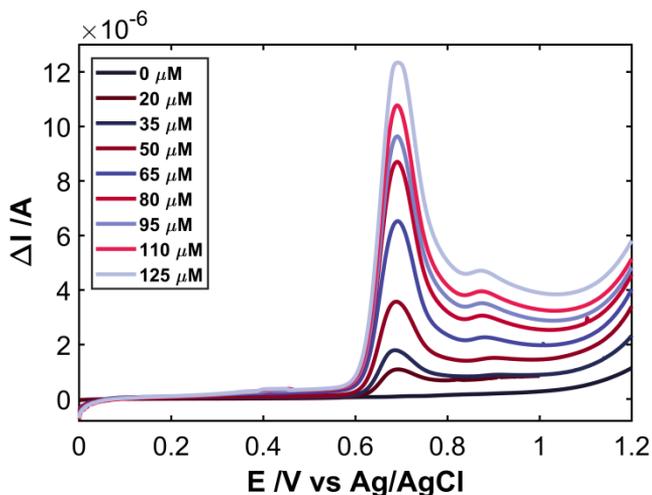
En ambas figuras se puede observar las otras dos bandas del colorante E-110 centradas en 313 nm y 263 nm. Esta banda (487 nm) está relacionada con la oxidación del amarillo ocaso FCF. El voltabsorciograma a 487 nm, Figura 164c, muestra el decrecimiento progresivo de la absorbancia, lentamente al principio y luego más rápidamente a medida que se oxida el colorante. La Figura 164d muestra la derivada del voltabsorciograma a 487 nm junto al voltamperograma del E-110.

### **2.2. Electrodo de nanofibras de carbono**

Así mismo se va a comprobar que nuestros electrodos de nanofibras de carbono son útiles en la determinación de este colorante. Se empleará un electrodo de 1 mL de CNFs impregnadas en un filtro de teflón (CNFs/PTFE/PET). El área del electrodo está delimitada con una pieza de teflón que posee un orificio en el centro de 5 mm de diámetro. Las concentraciones del calibrado van entre 20 -125  $\mu\text{M}$  de E-110 en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) a pH 6.

El equipo utilizado es un Galvanostato/potenciostato CHI 900 (CH Instruments), siendo la técnica empleada una voltamperometría lineal entre +0 V y +1.2 V a una velocidad de barrido de 0.01 V  $\text{s}^{-1}$ .

La Figura 165 muestra el pico de oxidación del amarillo ocaso FCF centrado en torno a +0.68 V, el cual aumenta a medida que aumenta la concentración del colorante.



**Figura 165. Voltamperometría lineal a concentraciones crecientes de amarillo ocaso FCF (20 - 125  $\mu\text{M}$ ) para un electrodo de CNFs/PTFE/PET.**

Los voltamperogramas obtenidos durante la experiencia electroquímica del amarillo ocaso presentan una buena relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de E-110. Tras llevar un análisis robusto por regresión por mínimos cuadrados (LMS) se obtienen:

$\Delta I \text{ (A)} = 1.04 \cdot 10^{-7} \cdot C_{E-110} \text{ (}\mu\text{M)} - 1.53 \cdot 10^{-6}$ . El coeficiente de determinación y el error estándar residual son respectivamente  $R^2 = 0.988$  y  $S_{yx} = 4.99 \cdot 10^{-7}$ .

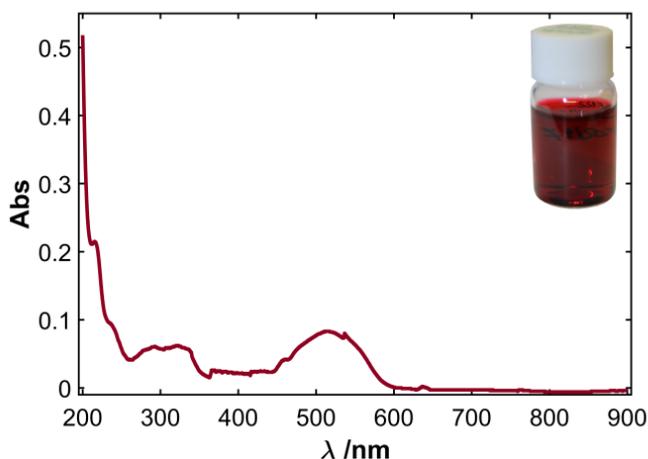
Además se calcula el límite de detección [295] con el modelo lineal obteniendo un valor de 23.98  $\mu\text{M}$  de E-110.

Con estos resultados se analiza la reproducibilidad del método empleando las pendientes de 3 calibrados diferentes obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La media de las pendientes  $1.051 \cdot 10^{-7} \pm 7.26 \cdot 10^{-9} \cdot \text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$  y la desviación estándar relativa  $\% \text{RSD} = 3.76\%$ ,  $n=3$  indican que estos electrodos muestran una buena reproducibilidad.

### 3. Determinación de azorrubina

#### 3.1. Electrodo de carbono comercial

La azorrubina o E-122 es un colorante habitual cuando se desea proporcionar una coloración roja al alimento. Su estructura química se encuentra descrita en la Figura 7. Su espectro UV-Vis, medido gracias a un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 159), es el de la Figura 166.

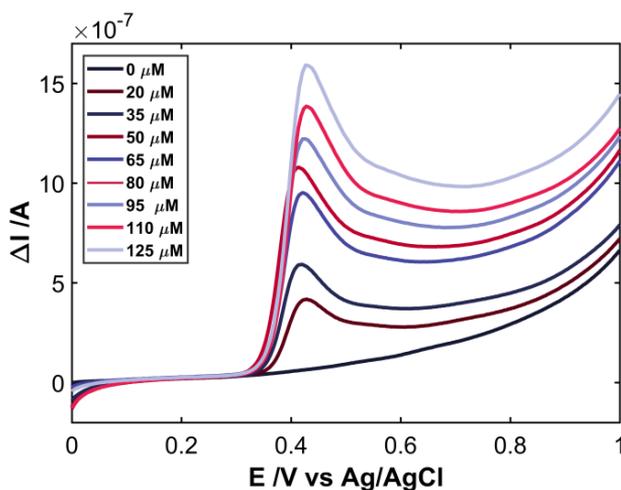


**Figura 166. Espectro UV-Vis de azorrubina o E-122.**

Como se observa la azorrubina presenta dos bandas centradas en torno a 317 nm y 514 nm, siendo esta última la más intensa y la que se va a emplear como característica de este colorante.

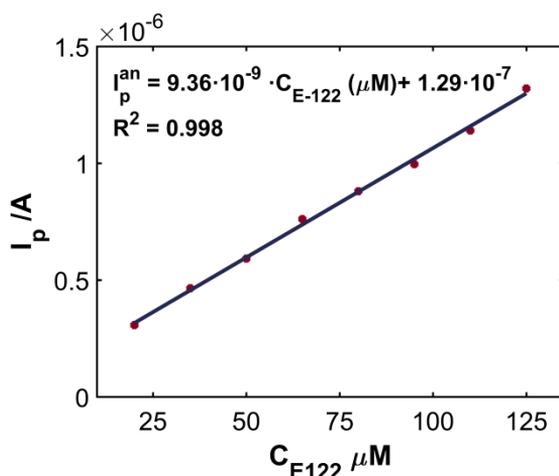
El rango de concentración elegido para el calibrado se encuentra en el rango de concentraciones en el que el detector del equipo de espectroelectroquímica sea capaz de detectar la señal espectral. Las concentraciones van entre 20 -125  $\mu\text{M}$  de E-122 en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) a pH 6. Los parámetros de la experiencia

voltamperométrica son un barrido entre +0 V y +1 V a una velocidad de barrido de  $0.01 \text{ V s}^{-1}$ .



**Figura 167. Voltamperometría lineal a concentraciones crecientes de azorubina (20 - 125  $\mu\text{M}$ ) para un electrodo de carbono comercial.**

Los voltamperogramas obtenidos durante la experiencia electroquímica de azorubina presentan una buena relación lineal entre la intensidad de pico (centrado en torno a +0.43 V) y la concentración de E-122.



**Figura 168. Regresión lineal robusta para el pico anódico.**

Tras llevar un análisis robusto por regresión por mínimos cuadrados (LMS) se obtienen:

$\Delta I (A) = 9.36 \cdot 10^{-9} \cdot C_{E-122} (\mu M) + 1.29 \cdot 10^{-7}$  . El coeficiente de determinación y el error estándar residual son  $R^2 = 0.998$  y  $S_{yx} = 1.84 \cdot 10^{-8}$ .

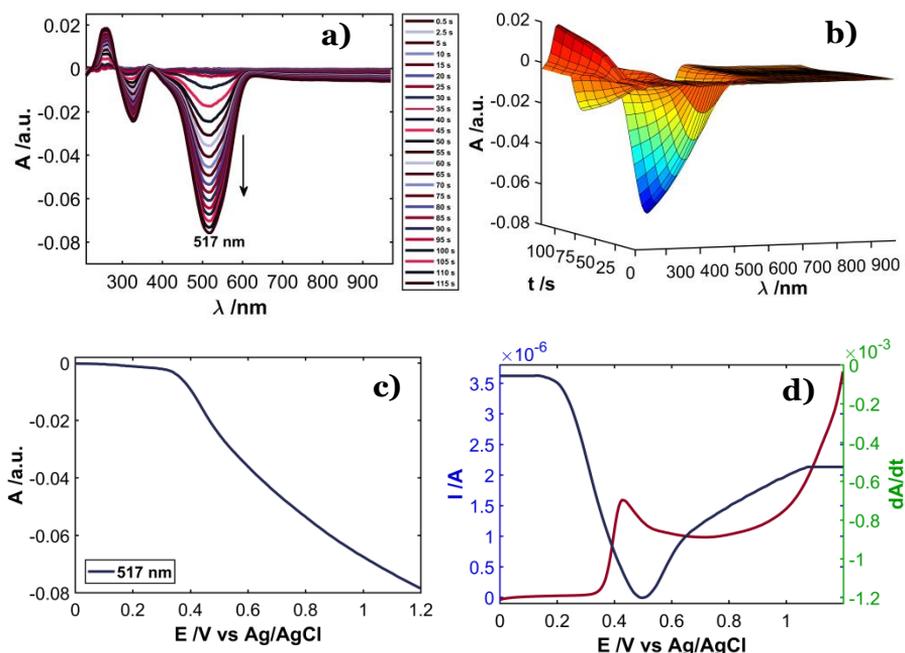
Además se calcula el límite de detección con el modelo lineal obteniendo un valor de 9.7  $\mu M$  de E-122.

Con estos resultados se analiza la reproducibilidad del método empleando las pendientes de 3 calibrados diferentes obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales. La media de las pendientes  $9.26 \cdot 10^{-9} \pm 2.23 \cdot 10^{-10} \cdot A \cdot \mu M^{-1}$  y la desviación estándar relativa  $\%RSD = 1.31\%$ ,  $n=3$  indican que estos electrodos muestran una buena reproducibilidad.

Además, el empleo de este analito nos permite utilizar técnicas espectroelectroquímicas debido a que la azorrubina presenta dos bandas en el UV-Vis.

Para este propósito simultáneamente a la realización de la voltamperometría lineal se recoge el espectro UV-Vis colocando la sonda cerca de la superficie electródica para una concentración 125  $\mu M$  de E-122.

La Figura 169a muestra la señal espectral UV-Vis del amarillo ocaso FCF, en el que la banda principal centrada a 517 nm decrece a medida que la experiencia evoluciona.



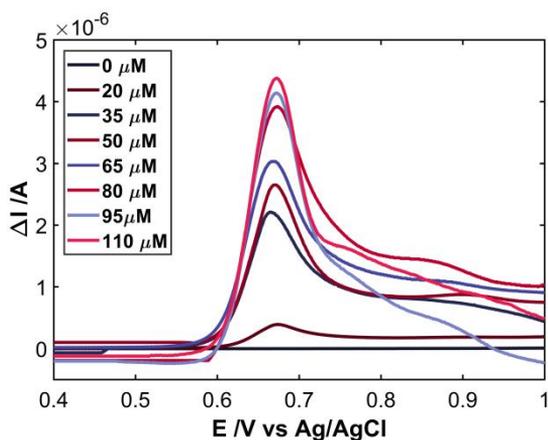
**Figura 169.** Señales espectroelectroquímicas obtenidas para azorrubina 125  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) para un voltamperometría lineal. a) Espectro UV-Vis, b) Representación 3D absorbancia vs potencial/tiempo, c) Voltabsorciograma a 517 nm y d) derivada del voltabsorciograma a 517 nm y voltamperograma lineal.

La Figura 169b muestra los cambios espectrales en 3D, mostrando lo mismo que en la Figura 169a, la banda a 517 nm decrece durante el barrido. En ambas figuras se puede observar la otra banda del colorante E-122 centrada en 327 nm. Esta banda (517 nm) está relacionada con la oxidación de la azorrubina. El voltabsorciograma a 517 nm, Figura 169c, muestra el decrecimiento progresivo de la absorbancia, lentamente al principio y luego más rápidamente a medida que se oxida el colorante. La Figura 169d muestra la derivada del voltabsorciograma a 517 nm junto al voltamperograma del E-122.

### 3.2. Electrodo de nanofibras de carbono

Así mismo se va a comprobar que nuestros electrodos de nanofibras de carbono son útiles en la determinación de este colorante. Se empleará un electrodo de 1 mL de CNFs impregnadas en un filtro de teflón (CNFs/PTFE/PET). El área del electrodo está delimitada con una pieza de teflón que posee un orificio en el centro de 5 mm de diámetro. Las concentraciones del calibrado van entre 20 -110  $\mu\text{M}$  de E-122 en tampón fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) a pH 6.

El equipo utilizado es un Galvanostato/potenciostato CHI 900 (CH Instruments), siendo la técnica empleada una voltamperometría lineal entre +0.4 V y +1 V a una velocidad de barrido de 0.01  $\text{V s}^{-1}$ .



**Figura 170. Voltamperometría lineal a concentraciones crecientes de azorubina (20 - 110  $\mu\text{M}$ ) para un electrodo de CNFs/PTFE/PET.**

La Figura 170 muestra el pico de oxidación de la azorubina centrado en torno a +0.67 V, el cual aumenta a medida que aumenta la concentración del colorante.

Los voltamperogramas obtenidos durante la experiencia electroquímica de la azorubina presentan una buena relación

lineal entre la intensidad de pico y la concentración de E-122. Tras llevar un análisis robusto por regresión por mínimos cuadrados (LMS) se obtienen:

$\Delta I (A) = 3.94 \cdot 10^{-8} \cdot C_{E-122} (\mu M) - 9.67 \cdot 10^{-9}$  . El coeficiente de determinación y el error estándar residual son  $R^2 = 0.92$  y  $S_{yx} = 4.24 \cdot 10^{-7}$ .



*Conclusiones y  
perspectivas de futuro*





A la vista de los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones:

1. Se ha diseñado una metodología para preparar filtros impregnados con nanotubos o nanofibras de carbono que pueden ser empleados como electrodos.
2. Estos electrodos pueden ser modificados con el empleo de técnicas, químicas y electroquímicas, para la determinación de metales pesados. La síntesis electroquímica de nanopartículas de bismuto permite implementarlas en el sistema de fabricación del electrodo, obteniendo electrodos del tipo BiNPs/CNFs/PTFE/PET. Estos electrodos proporcionan buenos resultados en la determinación de cadmio, con una buena reproducibilidad.

Esto permite la sustitución de las nanopartículas de bismuto por otro tipo de nanopartículas como por ejemplo de oro.

3. Se han utilizado distintos disolventes como dispersantes de las nanofibras de carbono, siendo el etanol el que proporciona los mejores resultados, obteniendo una superficie electródica impregnada sobre los filtros más homogénea. Este disolvente se caracteriza por ser barato y poseer una baja toxicidad.
4. El electrodo CNFs/PTFE/PET es fácil de preparar y proporciona buenos resultados con diferentes analitos. Posee un buen comportamiento y reproducibilidad.
5. Se han diseñado, desarrollado y fabricado celdas para ser utilizadas con técnicas electroquímicas y

espectroelectroquímicas. Las celdas están fabricadas en teflón y se caracterizan porque ser económicas, de fácil manejo que permiten mantener la reproducibilidad durante las diferentes experiencias.

6. Adquisición de conocimientos de técnicas electroquímicas y espectroelectroquímicas. Manejo de diversos instrumentos y equipos de diferentes casas comerciales.

Este trabajo no es algo con un final sino que lo realizado hasta ahora tiene perspectivas de futuro:

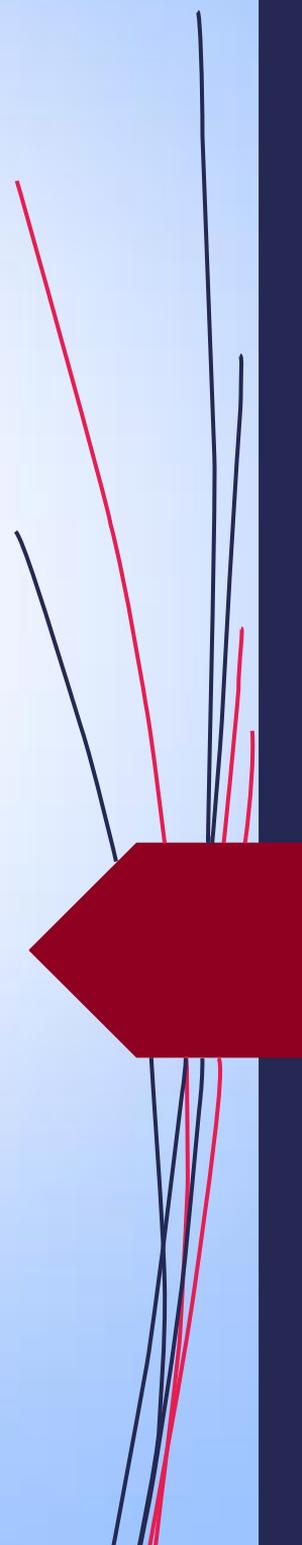
- El empleo de las técnicas espectroelectroquímicas y métodos estadísticos para la resolución de mezclas binarias y ternarias de colorantes.
- El empleo de la metodología de fabricación del electrodo para crear nuevos electrodos con diversos tipos de modificaciones sobre la superficie de carbono.

Para terminar quiero resaltar que durante la realización de esta tesis doctoral he adquirido amplios conocimientos de técnicas electroquímicas, espectroelectroquímicas y distintas metodologías de trabajo en el laboratorio.





# *Bibliografia*



## Bibliografia

---

- 
- [1] J. T. Stock, «Gabriel Lippmann and the capillary electrometer.», *Bull. Hist. Chem*, vol. 29, n.º 1, pp. 16-20, 2004.
- [2] G. E. Burch y N. P. DePasquale, *A History of Electrocardiography*. San Francisco: Norman Publishing, 1990.
- [3] M. Heyrovský, «Polarography—past, present, and future», *J. Solid State Electrochem.*, vol. 15, n.º 7-8, pp. 1799-1803, 2011.
- [4] J. Heyrovský, «The processes at the mercury dropping cathode. Part I. The deposition of metals», *Trans. Faraday Soc.*, vol. 19, n.º 3, pp. 692-702, 1924.
- [5] J. Heyrovský y M. Shikata, «Researches with the dropping mercury cathode. II. The polarograph», *Rec. Trav. Chim.*, vol. 44, n.º 6, p. 496, 1925.
- [6] A. J. Bard, «The rise of voltammetry: From polarography to the scanning electrochemical microscope», *J. Chem. Educ.*, vol. 84, n.º 4, pp. 644-650, 2007.
- [7] J. Heyrovský, «The Trends of Polarography», *Nobel Lect.*, pp. 565-584, 1959.
- [8] K. H. Lubert y K. Kalcher, «History of electroanalytical methods», *Electroanalysis*. 2010.
- [9] T. Riley y A. Watson, *Polarography and other Voltammetric Methods*. Londres: John Wiley & Sons, 1987.
- [10] R. Francis y R. Annick, *Chemical Analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Wiley, 2000.
- [11] J. Heyrovský y J. Kůta, *Principles of Polarography*, 1st ed. 1965.
- [12] J. G. Webster, Ed., *The Measurement, Instrumentation and Sensors Handbook*. CRC Press, 1999.

- [13] UE, «Directiva del Consejo de 22 de marzo de 1982 relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los vertidos de mercurio del sector de la electrólisis de los cloruros alcalinos.», 1982.
- [14] EU, «Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Estrategia comunitaria sobre el mercurio». pp. 1-12, 2005.
- [15] EU, «Reglamento (CE) N° 1102/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2008 relativo a la prohibición de la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio y al almacenamiento seguro de mercurio metálico», 2008.
- [16] D. O. de la U. Europea, «Reglamento (UE) N° 847/2012 de la Comisión de 19 de septiembre de 2012 por el que se modifica, en lo que respecta al mercurio, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la aut», 2012.
- [17] K. M. Rice, E. M. Walker, M. Wu, C. Gillette, y E. R. Blough, «Environmental mercury and its toxic effects», *J. Prev. Med. Public Heal.*, vol. 47, n.º 2, pp. 74-83, 2014.
- [18] A. M. Bond, *Modern Polarographic methods in Analytical Chemistry*. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 1980.
- [19] J. Wang, J. Lu, S. Hocevar, P. Farias, y B. Ogorevc, «Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry», *Anal. Chem.*, vol. 72, n.º 14, pp. 3218-22, jul. 2000.
- [20] J. Wang, «Stripping analysis at bismuth electrodes: A review», *Electroanalysis*, vol. 17, n.º 15-16, pp. 1341-1346, 2005.
- [21] M. Morfobos, A. Economou, y A. Voulgaropoulos,

- «Simultaneous determination of nickel(II) and cobalt(II) by square wave adsorptive stripping voltammetry on a rotating-disc bismuth-film electrode», *Anal. Chim. Acta*, vol. 519, n.º 1, pp. 57-64, ago. 2004.
- [22] E. A. Hutton, S. B. Hočevár, y B. Ogorevc, «Ex situ preparation of bismuth film microelectrode for use in electrochemical stripping microanalysis», *Anal. Chim. Acta*, vol. 537, n.º 1-2, pp. 285-292, 2005.
- [23] A. Economou y A. Voulgaropoulos, «On-line stripping voltammetry of trace metals at a flow-through bismuth-film electrode by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection system», *Talanta*, vol. 71, n.º 2, pp. 758-765, 2007.
- [24] C. and Kokkinos y A. Economou, «Stripping Analysis at Bismuth-Based Electrodes», *Curr. Anal. Chem.*, vol. 4, n.º 3, pp. 183-190, 2008.
- [25] G. Wittstock, A. Strübing, R. Szargan, y G. Werner, «Glucose oxidation at bismuth-modified platinum electrodes», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 444, pp. 61-73, 1998.
- [26] S. Legeai, K. Soropogui, M. Cretinon, O. Vittori, A. Heeren De Oliveira, F. Barbier, y M.-F. Grenier-Loustalot, «Economic bismuth-film microsensor for anodic stripping analysis of trace heavy metals using differential pulse voltammetry.», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 383, n.º 5, pp. 839-47, nov. 2005.
- [27] E. a. Hutton, S. B. Hočevár, B. Ogorevc, y M. R. Smyth, «Bismuth film electrode for simultaneous adsorptive stripping analysis of trace cobalt and nickel using constant current chronopotentiometric and voltammetric protocol», *Electrochem. commun.*, vol. 5, n.º 9, pp. 765-769, sep. 2003.
- [28] E. Chatzitheodorou, A. Economou, y A. Voulgaropoulos,

- «Trace Determination of Chromium by Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetry on Bismuth Film Electrodes», *Electroanalysis*, vol. 16, n.º 21, pp. 1745-1754, nov. 2004.
- [29] A. Królicka y A. Bobrowski, «Bismuth film electrode for adsorptive stripping voltammetry – electrochemical and microscopic study», *Electrochem. commun.*, vol. 6, n.º 2, pp. 99-104, feb. 2004.
- [30] E. A. Hutton, B. Ogorevc, y M. R. Smyth, «Cathodic Electrochemical Detection of Nitrophenols at a Bismuth Film Electrode for Use in Flow Analysis», *Electroanalysis*, vol. 16, n.º 19, pp. 1616-1621, oct. 2004.
- [31] Z. Guo, F. Feng, Y. Hou, y N. Jaffrezic-Renault, «Quantitative determination of zinc in milkvetch by anodic stripping voltammetry with bismuth film electrodes.», *Talanta*, vol. 65, n.º 4, pp. 1052-5, feb. 2005.
- [32] A. Charalambous y A. Economou, «A study on the utility of bismuth-film electrodes for the determination of In(III) in the presence of Pb(II) and Cd(II) by square wave anodic stripping voltammetry», *Anal. Chim. Acta*, vol. 547, n.º 1, pp. 53-58, ago. 2005.
- [33] M. Yang y Z. Hu, «Electrodeposition of bismuth onto glassy carbon electrodes from nitrate solutions», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 583, n.º 1, pp. 46-55, sep. 2005.
- [34] S. B. Hocevar, J. Wang, R. P. Deo, y B. Ogorevc, «Potentiometric Stripping Analysis at Bismuth-Film Electrode», *Electroanalysis*, vol. 14, n.º 2, pp. 112-115, ene. 2002.
- [35] E. O. Jorge, M. M. Rocha, I. T. E. Fonseca, y M. M. M. Neto, «Studies on the stripping voltammetric determination and

- speciation of chromium at a rotating-disc bismuth film electrode», *Talanta*, vol. 81, n.º 1-2, pp. 556-564, 2010.
- [36] M. Zidan, T. W. Tee, A. H. Abdullah, y Z. Zainal, «Electrochemical Oxidation of Paracetamol Mediated by Nanoparticles Bismuth Oxide Modified Glassy Carbon Electrode», *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 6, pp. 279-288, 2011.
- [37] Z. D. Anastasiadou, I. Sipaki, P. D. Jannakoudakis, y S. T. Girousi, «Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry (SWASV) for the Determination of Ecotoxic Metals, Using a Bismuth-Film Electrode», *Anal. Lett.*, vol. 44, n.º 5, pp. 761-777, 2011.
- [38] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, y R. Naidu, «Determination of Trace Lead and Cadmium in Water Samples by Anodic Stripping Voltammetry with a Nafion-Ionic Liquid-Coated Bismuth Film Electrode», *Electroanalysis*, vol. 26, n.º 3, pp. 639-647, 2014.
- [39] Ü. A. Kıröz, S. Marín, M. Pumera, A. Merkoçi, y S. Alegret, «Stripping Voltammetry with Bismuth Modified Graphite-Epoxy Composite Electrodes», *Electroanalysis*, vol. 17, n.º 10, pp. 881-886, may 2005.
- [40] M. T. Castañeda, B. Pérez, M. Pumera, M. del Valle, A. Merkoçi, S. Alegret, B. Pe, M. Valle, y A. Merkoçi, «Sensitive stripping voltammetry of heavy metals by using a composite sensor based on a built-in bismuth precursor.», *Analyst*, vol. 130, n.º 6, pp. 971-6, 2005.
- [41] L. Lin, S. Thongngamdee, J. Wang, Y. Lin, O. a. Sadik, y S.-Y. Ly, «Adsorptive stripping voltammetric measurements of trace uranium at the bismuth film electrode», *Anal. Chim. Acta*, vol. 535, n.º 1-2, pp. 9-13, abr. 2005.

- [42] M. A. Granado Rico, M. Olivares-Marín, y E. Pinilla Gil, «Modification of carbon screen-printed electrodes by adsorption of chemically synthesized Bi nanoparticles for the voltammetric stripping detection of Zn(II), Cd(II) and Pb(II).», *Talanta*, vol. 80, pp. 631-635, 2009.
- [43] L. a. Piankova, N. a. Malakhova, N. Y. Stozhko, K. Z. Brainina, a. M. Murzakaev, y O. R. Timoshenkova, «Bismuth nanoparticles in adsorptive stripping voltammetry of nickel», *Electrochem. commun.*, vol. 13, n.º 9, pp. 981-984, sep. 2011.
- [44] H. Xu, L. Zeng, S. Xing, Y. Xian, G. Shi, y L. Jin, «Ultrasensitive Voltammetric Detection of Trace Lead(II) and Cadmium(II) Using MWCNTs-Nafion/Bismuth Composite Electrodes», *Electroanalysis*, vol. 20, n.º 24, pp. 2655-2662, dic. 2008.
- [45] X. Jia, J. Li, y E. Wang, «High-Sensitivity Determination of Lead(II) and Cadmium(II) Based on the CNTs-PSS/Bi Composite Film Electrode», *Electroanalysis*, vol. 22, n.º 15, pp. 1682-1687, jun. 2010.
- [46] G. H. Hwang, W. K. Han, J. S. Park, y S. G. Kang, «Determination of trace metals by anodic stripping voltammetry using a bismuth-modified carbon nanotube electrode.», *Talanta*, vol. 76, n.º 2, pp. 301-8, jul. 2008.
- [47] Q. M. Feng, Q. Zhang, C. G. Shi, J. J. Xu, N. Bao, y H. Y. Gu, «Using nanostructured conductive carbon tape modified with bismuth as the disposable working electrode for stripping analysis in paper-based analytical devices», *Talanta*, vol. 115, pp. 235-240, 2013.
- [48] H. and simultaneous detection of heavy metal ions based on three-dimensional graphene-carbon nanotubes hybrid

- electrode materials Huang, T. Chen, X. Liu, y H. Ma, «Ultrasensitive and simultaneous detection of heavy metal ions based on three-dimensional graphene-carbon nanotubes hybrid electrode materials», *Anal. Chim. Acta*, vol. 852, pp. 45-54, 2014.
- [49] N. Ruecha, N. Rodthongkum, D. M. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, y C. S. Henry, «Sensitive electrochemical sensor using a graphene-polyaniline nanocomposite for simultaneous detection of Zn(II), Cd(II), and Pb(II)», *Anal. Chim. Acta*, vol. 874, pp. 40-48, 2015.
- [50] S. Chaiyo, E. Mehmeti, K. Zagar, W. Siangproh, O. Chailapakul, y K. Kalcher, «Electrochemical sensors for the simultaneous determination of zinc, cadmium and lead using a Nafion/ionic liquid/graphene composite modified screen-printed carbon electrode», *Anal. Chim. Acta*, vol. 918, pp. 26-34, 2016.
- [51] H. Huang, W. Zhu, X. Gao, X. Liu, y H. Ma, «Synthesis of a novel electrode material containing phytic acid-polyaniline nanofibers for simultaneous determination of cadmium and lead ions», *Anal. Chim. Acta*, vol. 947, pp. 32-41, 2016.
- [52] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, y R. Naidu, «Voltammetric Determination of Lead (II) and Cadmium (II) Using a Bismuth Film Electrode Modified with Mesoporous Silica Nanoparticles», *Electrochim. Acta*, vol. 132, pp. 223-229, 2014.
- [53] P. Niu, C. Fernández-Sánchez, M. Gich, C. Ayora, y A. Roig, «Electroanalytical assessment of heavy metals in waters with bismuth nanoparticle-porous carbon paste electrodes», *Electrochim. Acta*, vol. 165, pp. 155-161, 2015.
- [54] L. Tang, J. Chen, G. Zeng, Y. Zhu, Y. Zhang, Y. Zhou, X. Xie,

- G. Yang, y S. Zhang, «Ordered mesoporous carbon and thiolated polyaniline modified electrode for simultaneous determination of cadmium(II) and lead(II) by anodic stripping voltammetry», *Electroanalysis*, vol. 26, n.º 10, pp. 2283-2291, 2014.
- [55] J. Wang, X. Chen, K. Wu, M. Zhang, y W. Huang, «Highly-sensitive Electrochemical Sensor for Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> Based on the Synergistic Enhancement of Exfoliated Graphene Nanosheets and Bismuth», *Electroanalysis*, vol. 28, n.º 1, pp. 63-68, 2016.
- [56] L. Zhu, L. Xu, B. Huang, N. Jia, L. Tan, y S. Yao, «Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) using square wave anodic stripping voltammetry at a gold nanoparticle-graphene-cysteine composite modified bismuth film electrode», *Electrochim. Acta*, vol. 115, pp. 471-477, 2014.
- [57] A. A. Saeed, B. Singh, M. Nooredeen Abbas, y E. Dempsey, «Evaluation of Bismuth Modified Carbon Thread Electrode for Simultaneous and Highly Sensitive Cd (II) and Pb (II) Determination», *Electroanalysis*, vol. 28, n.º 9, pp. 2205-2213, 2016.
- [58] G. L. Kreft, O. C. De Braga, y A. Spinelli, «Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface», *Electrochim. Acta*, vol. 83, pp. 125-132, 2012.
- [59] K. Asadpour-Zeynali y F. Mollarasouli, «Bismuth and Bismuth-Chitosan modified electrodes for determination of two synthetic food colorants by net analyte signal standard addition method», *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 12, n.º 6, pp. 711-718, 2014.
- [60] R. Pauliukaitė y C. M. A. M. A. Brett, «Characterization and

- Application of Bismuth-Film Modified Carbon Film Electrodes», *Electroanalysis*, vol. 17, n.º 15-16, pp. 1354-1359, ago. 2005.
- [61] a Economou, «Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 24, n.º 4, pp. 334-340, abr. 2005.
- [62] M. T. Castañeda, B. Pérez, M. Pumera, M. del Valle, a Merkoçi, y S. Alegret, «Sensitive stripping voltammetry of heavy metals by using a composite sensor based on a built-in bismuth precursor.», *Analyst*, vol. 130, n.º 6, pp. 971-6, jun. 2005.
- [63] A. Alberich, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, y M. Esteban, «Substitution of Mercury Electrodes by Bismuth-Coated Screen-Printed Electrodes in the determination of Quinine in Tonic Water», *J. Chem. Educ.*, vol. 90, n.º 12, pp. 1681-1684, 2013.
- [64] M. Štěpánková, R. Šelešovská, L. Janíková, J. Chýlková, y I. Švancara, «Sensitive electrochemical sensor for the determination of folic acid based on a bismuth-film electrode», *Monatsh Chem*, 2016.
- [65] V. Guzsvány, Z. Papp, J. Zbiljic, O. Vajdle, y M. Rodic, «Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides», *Molecules*, vol. 16, pp. 4451-4466, 2011.
- [66] S. Iijima, «Helical microtubes of graphitic carbon», *Nature*, vol. 354, pp. 56-58, 1991.
- [67] P. M. Ajayan, «Nanotubes from Carbon», *Chem. Rev.*, vol. 99, pp. 1787-1799, 1999.
- [68] B. Bhushan, D. Luo, S. R. Schricker, W. Sigmund, y S. Zauscher, Eds., *Handbook of Nanomaterials Properties*, n.º

- April. Berlin: Springer, 2014.
- [69] A. J. Bard, G. Inzelt, y F. Scholz, Eds., *Electrochemical Dictionary*, Segunda. Springer, 2012.
- [70] J. Huang, Y. Liu, y T. You, «Carbon nanofiber based electrochemical biosensors: A review».
- [71] Y. A. Kim, T. Hayashi, M. Endo, y M. S. Dresselhaus, «Carbon Nanofibers», en *Handbook of Nanomaterials*, R. Vajtai, Ed. Springer, 2013, pp. 233-262.
- [72] L. Feng, N. Xie, y J. Zhong, «Carbon nanofibers and their composites: A review of synthesizing, properties and applications», *Materials (Basel)*., vol. 7, n.º 5, pp. 3919-3945, 2014.
- [73] I. Kang, Y. Y. Heung, J. H. Kim, J. W. Lee, R. Gollapudi, S. Subramaniam, S. Narasimhadevara, D. Hurd, G. R. Kirikera, V. Shanov, M. J. Schulz, D. Shi, J. Boerio, S. Mall, y M. Ruggles-Wren, «Introduction to carbon nanotube and nanofiber smart materials», *Compos. Part B Eng.*, vol. 37, n.º 6, pp. 382-394, 2006.
- [74] R. T. K. Baker, «Carbon Nanofibers», en *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, 2001, pp. 932-941.
- [75] P. Serp, M. Corrias, y P. Kalck, «Carbon nanotubes and nanofibers in catalysis», *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 253, pp. 337-358, 2003.
- [76] M. Bystrzejewski, A. Huczko, y H. Lange, «Arc plasma route to carbon-encapsulated magnetic nanoparticles for biomedical applications», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 109, n.º 1, pp. 81-85, 2005.
- [77] S. G. Prolongo, M. R. Gude, J. Sanchez, y a. Ureña, «Nanoreinforced Epoxy Adhesives for Aerospace Industry»,

- J. Adhes.*, vol. 85, n.º 4-5, pp. 180-199, 2009.
- [78] J. Kong, W. A. Yee, Y. Wei, L. Yang, J. M. Ang, S. L. Phua, S. Y. Wong, R. Zhou, Y. Dong, X. Li, y X. Lu, «Silicon nanoparticles encapsulated in hollow graphitized carbon nanofibers for lithium ion battery anodes.», *Nanoscale*, pp. 2967-2973, 2013.
- [79] S. E. F. Kleijn, S. C. S. Lai, M. T. M. Koper, y P. R. Unwin, «Electrochemistry of nanoparticles.», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 53, n.º 14, pp. 3558-86, abr. 2014.
- [80] M. Faraday, «The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light», ... *Trans. R. Soc. ...*, vol. 147, n.º 0, pp. 145-181, 1857.
- [81] J. Turkevich, P. C. Stevenson, y J. Hiller, «A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold», *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, pp. 55-75, 1951.
- [82] C. N. Tharamani, H. C. Thejaswini, y S. Sampath, «Synthesis of size-controlled Bi particles by electrochemical deposition», *Bull. Mater. Sci.*, vol. 31, n.º 3, pp. 207-212, sep. 2008.
- [83] España, «Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos de cultivo». pp. 1-27, 2010.
- [84] EU, «Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios», *Diario Oficial de la Unión Europea*, n.º L364. pp. 5-24, 2006.
- [85] EU, «Reglamento (UE) No 488/2014 de la Comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de

- cadmio en los productos alimenticios», *D. Of. la Unión Eur.*, n.º L138, pp. 75-79, 2014.
- [86] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, y K. N. Beeregowda, «Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals», *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 7, n.º 2, pp. 60-72, 2014.
- [87] A. Bernard, «Cadmium & its adverse effects on human health.», *Indian J. Med. Res.*, vol. 128, n.º 4, pp. 557-64, 2008.
- [88] J. O. Duruibe, M. O. C. Ogwuegbu, y J. N. Egwurugwu, «Heavy metal pollution and human biotoxic effects», *Int. J. Phys. Sci.*, vol. 2, n.º 5, pp. 112-118, 2007.
- [89] A. Luch, Ed., *Molecular, clinical and environmental toxicology*, vol. 3. Berlin: Springer, 2012.
- [90] R. K. Sharma y M. Agrawal, «Biological effects of heavy metals: An overview», vol. 26, n.º 2, p. 313, 2005.
- [91] L. Järup, «Hazards of heavy metal contamination», *Br. Med. Bull.*, vol. 68, pp. 167-182, 2003.
- [92] C. Byrne, S. D. Divekar, G. B. Storchan, D. A. Parodi, y M. B. Martin, «Metals and breast cancer», *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 18, n.º 1, pp. 63-73, 2013.
- [93] M. A. Janusa y J. N. Beck, «Recent Applications of Flame Atomic Absorption Spectrometry To Environmental Measurements», *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 37, n.º 2, pp. 137-186, 2002.
- [94] H. Bagheri, A. Afkhami, M. Saber-Tehrani, y H. Khoshsafar, «Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using

- atomic absorption spectrometry», *Talanta*, vol. 97, pp. 87-95, 2012.
- [95] A. C. M. Aleluia, F. A. de Santana, G. C. Brandao, y S. L. C. Ferreira, «Sequential determination of cadmium and lead in organic pharmaceutical formulations using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry», *Microchem. J.*, vol. 130, pp. 157-161, 2017.
- [96] J. S. Mandlate, B. M. Soares, T. S. Seeger, P. D. Vecchia, P. A. Mello, E. M. M. Flores, y F. A. Duarte, «Determination of cadmium and lead at sub-ppt level in soft drinks: An efficient combination between dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry», *Food Chem.*, vol. 221, pp. 907-912, 2017.
- [97] S. S. de Oliveira Borges, M. A. Beinner, y J. B. B. Silva, «Direct Method for Determination of Al, Cd, Cu, and Pb in Beers In Situ Digested by GF AAS Using Permanent Modifiers», *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 167, n.º 1, pp. 155-163, 2015.
- [98] M. R. Gomez, S. Cerutti, L. L. Sombra, M. F. Silva, y L. D. Martínez, «Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 45, n.º 6, pp. 1060-1064, 2007.
- [99] C. K. De Andrade, V. E. Dos Anjos, M. L. Felsner, Y. R. Torres, y S. P. Quináia, «Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry», *Food Chem.*, vol. 146, pp. 166-173, 2014.
- [100] J. Álvarez Méndez, J. Barciela García, S. García Martín, R. M. Peña Crecente, y C. Herrero Latorre, «Determination of

- cadmium and lead in urine samples after dispersive solid-liquid extraction on multiwalled carbon nanotubes by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry», *Spectrochim. Acta - Part B*, vol. 106, pp. 13-19, 2015.
- [101] V. Ivanova-Petropulos, S. Jakabová, D. Nedelkovski, V. Pavlik, Z. Balázová, y O. Hegedús, «Determination of Pb and Cd in Macedonian Wines by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS)», *Food Anal. Methods*, vol. 8, pp. 1947-1952, 2015.
- [102] M. R. Sohrabi, Z. Matbouie, A. A. Asgharinezhad, y A. Dehghani, «Solid phase extraction of Cd(II) and Pb(II) using a magnetic metal-organic framework, and their determination by FAAS», *Microchim. Acta*, vol. 180, n.º 7-8, pp. 589-597, 2013.
- [103] T. Daşbaşı, Ş. Saçmacı, A. Ülgen, y Ş. Kartal, «A solid phase extraction procedure for the determination of Cd(II) and Pb(II) ions in food and water samples by flame atomic absorption spectrometry», *Food Chem.*, vol. 174, n.º 11, pp. 591-596, 2015.
- [104] T. Daşbaşı, Ş. Saçmacı, A. Ülgen, y Ş. Kartal, «Determination of some metal ions in various meat and baby food samples by atomic spectrometry», *Food Chem.*, vol. 197, pp. 107-113, 2016.
- [105] Y. Chen, M. Li, L. Fu, X. Hou, y X. Jiang, «Simultaneous determination of trace cadmium and lead in single human hair by tungsten electrothermal vaporization-flame atomic fluorescence spectrometry», *Microchem. J.*, vol. 114, pp. 182-186, 2014.
- [106] Y. Li, Z. Zhu, H. Zheng, L. Jin, y S. Hu, «Significant signal enhancement of dielectric barrier discharge plasma induced

- vapor generation by using non-ionic surfactants for determination of mercury and cadmium by atomic fluorescence spectrometry», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 31, n.º 2, pp. 383-389, 2016.
- [107] Y. Zhao, Z. Li, A. Ross, Z. Huang, W. Chang, K. Ou-yang, Y. Chen, y C. Wu, «Determination of heavy metals in leather and fur by microwave plasma-atomic emission spectrometry», *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 112, pp. 6-9, 2015.
- [108] M. Faraji, Y. Yamini, A. Saleh, M. Rezaee, M. Ghambarian, y R. Hassani, «A nanoparticle-based solid-phase extraction procedure followed by flow injection inductively coupled plasma-optical emission spectrometry to determine some heavy metal ions in water samples», *Anal. Chim. Acta*, vol. 659, n.º 1-2, pp. 172-177, 2010.
- [109] C. Moor, T. Lymberopoulou, y V. J. Dietrich, «Determination of heavy metals in soils, sediments and geological materials by ICP-AES and ICP-MS», *Microchim. Acta*, vol. 136, n.º 3-4, pp. 123-128, 2001.
- [110] J. Djedjibegovic, T. Larssen, A. Skrbo, A. Marjanović, y M. Sober, «Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)», *Food Chem.*, vol. 131, n.º 2, pp. 469-476, 2012.
- [111] I. Wysocka y E. Vassileva, «Determination of cadmium, copper, mercury, lead and zinc mass fractions in marine sediment by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry applied as a reference method», *Microchem. J.*, vol. 128, pp. 198-207, 2016.

- [112] L. R. Verola Mataveli, M. L. Buzzo, L. Juncioni de Arauz, M. D. F. Henriques Carvalho, E. E. Kumagai Arakaki, R. Matsuzaki, y P. Tiglea, «Total Arsenic , Cadmium , and Lead Determination in Brazilian Rice Samples Using ICP-MS», *J. Anal. Methods Chem.*, p. 9, 2016.
- [113] E. I. Obiajunwa, D. A. Pelemo, S. A. Owolabi, M. K. Fasasi, y F. O. Johnson-Fatokun, «Characterisation of heavy metal pollutants of soils and sediments around a crude-oil production terminal using EDXRF», *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 194, n.º 1, pp. 61-64, 2002.
- [114] S. A. Alex, N. Chandrasekaran, y A. Mukherjee, «State-of-the-art strategies for the colorimetric detection of heavy metals using gold nanorods based on aspect ratio reduction», *Anal. Methods*, vol. 8, n.º 10, pp. 2131-2137, 2016.
- [115] H. Zhang, D. Faye, J. P. Lefèvre, J. A. Delaire, y I. Leray, «Selective fluorimetric detection of cadmium in a microfluidic device», *Microchem. J.*, vol. 106, pp. 167-173, 2013.
- [116] M. Li, X. Zhou, S. Guo, y N. Wu, «Detection of lead (II) with a “turn-on” fluorescent biosensor based on energy transfer from CdSe/ZnS quantum dots to graphene oxide», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 43, n.º 1, pp. 69-74, 2013.
- [117] W. Kong, X. Yang, M. Yang, H. Zhou, Z. Ouyang, y M. Zhao, «Photoluminescent nanosensors capped with quantum dots for high-throughput determination of trace contaminants: Strategies for enhancing analytical performance», *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 36-47, 2016.
- [118] N. Hao y K. Wang, «Recent development of

- electrochemiluminescence sensors for food analysis», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, n.º 25, pp. 7035-7048, 2016.
- [119] P. Zhang, Y. P. Chen, W. Wang, Y. Shen, y J. S. Guo, «Surface plasmon resonance for water pollutant detection and water process analysis», *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 153-165, 2016.
- [120] S. Zhan, Y. Wu, L. Wang, X. Zhan, y P. Zhou, «A mini-review on functional nucleic acids-based heavy metal ion detection», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 86, pp. 353-368, 2016.
- [121] M. R. Saidur, A. R. A. Aziz, y W. J. Basirun, «Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: A review», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 90, n.º September 2016, pp. 125-139, 2017.
- [122] D.-W. Li, W.-L. Zhai, Y.-T. Li, y Y.-T. Long, «Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants», *Microchim. Acta*, vol. 181, n.º 1-2, pp. 23-43, 2013.
- [123] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, y C. E. Efstathiou, «Lithographically fabricated disposable bismuth-film electrodes for the trace determination of Pb(II) and Cd(II) by anodic stripping voltammetry», *Electrochim. Acta*, vol. 53, n.º 16, pp. 5294-5299, 2008.
- [124] A. Afkhami, H. Ghaedi, T. Madrakian, y M. Rezaeivala, «Highly sensitive simultaneous electrochemical determination of trace amounts of Pb(II) and Cd(II) using a carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and a newly synthesized Schiff base», *Electrochim. Acta*, vol. 89, pp. 377-386, 2013.
- [125] P. M. Lee, Z. Chen, L. Li, y E. Liu, «Reduced graphene oxide decorated with tin nanoparticles through electrodeposition

- for simultaneous determination of trace heavy metals», *Electrochim. Acta*, vol. 174, pp. 207-214, 2015.
- [126] G. Zhao, Y. Yin, H. Wang, G. Liu, y Z. Wang, «Sensitive stripping voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) by a Bi/multi-walled carbon nanotube-emeraldine base polyaniline-Nafion composite modified glassy carbon electrode», *Electrochim. Acta*, vol. 220, pp. 267-275, 2016.
- [127] J. Ping, Y. Wang, J. Wu, y Y. Ying, «Development of an electrochemically reduced graphene oxide modified disposable bismuth film electrode and its application for stripping analysis of heavy metals in milk», *Food Chem.*, vol. 151, pp. 65-71, 2014.
- [128] K. C. Armstrong, C. E. Tatum, R. N. Dansby-Sparks, J. Q. Chambers, y Z.-L. Xue, «Individual and simultaneous determination of lead, cadmium, and zinc by anodic stripping voltammetry at a bismuth bulk electrode.», *Talanta*, vol. 82, n.º 2, pp. 675-80, jul. 2010.
- [129] D. Li, J. Jia, y J. Wang, «Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry based on graphite nanofibers-Nafion composite modified bismuth film electrode.», *Talanta*, vol. 83, n.º 2, pp. 332-6, dic. 2010.
- [130] C. Kokkinos y A. Economou, «Disposable Nafion-modified micro-fabricated bismuth-film sensors for voltammetric stripping analysis of trace metals in the presence of surfactants», *Talanta*, vol. 84, n.º 3, pp. 696-701, 2011.
- [131] S. J. R. Prabakar, C. Sakthivel, y S. S. Narayanan, «Hg(II) immobilized MWCNT graphite electrode for the anodic stripping voltammetric determination of lead and cadmium», *Talanta*, vol. 85, n.º 1, pp. 290-297, 2011.

- [132] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, y M. Esteban, «Sputtered bismuth screen-printed electrode: A promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in groundwater», *Talanta*, vol. 119, pp. 348-352, 2014.
- [133] Z. Li, L. Chen, F. He, L. Bu, X. Qin, Q. Xie, S. Yao, X. Tu, X. Luo, y S. Luo, «Square wave anodic stripping voltammetric determination of Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> at bismuth-film electrode modified with electroreduced graphene oxide-supported thiolated thionine», *Talanta*, vol. 122, pp. 285-292, 2014.
- [134] V. B. Dos Santos, E. L. Fava, N. S. De Miranda Curi, R. C. Faria, y O. Fatibello-Filho, «A thermostated electrochemical flow cell with a coupled bismuth film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of cadmium(II) and lead(II) in natural, wastewater and tap water samples», *Talanta*, vol. 126, pp. 82-90, 2014.
- [135] S. Cerovac, V. Guzsvány, Z. Kónya, A. M. Ashrafi, I. Švancara, S. Rončević, Á. Kukovecz, B. Dalmacija, y K. Vytřas, «Trace level voltammetric determination of lead and cadmium in sediment pore water by a bismuth-oxychloride particle-multiwalled carbon nanotube composite modified glassy carbon electrode», *Talanta*, vol. 134, pp. 640-649, 2015.
- [136] J. G. Ayenimo y S. B. Adeloju, «Inhibitive potentiometric detection of trace metals with ultrathin polypyrrole glucose oxidase biosensor», *Talanta*, vol. 137, pp. 62-70, 2015.
- [137] C. Pérez-Ràfols, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, y M. Esteban, «Penicillamine-modified sensor for the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in natural samples», *Talanta*, vol. 144, pp. 569-573, 2015.

- [138] C. Pérez-Ràfols, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, y M. Esteban, «Glutathione modified screen-printed carbon nanofiber electrode for the voltammetric determination of metal ions in natural samples», *Talanta*, vol. 155, pp. 8-13, 2016.
- [139] L. A. J. Silva, W. P. da Silva, J. G. Giuliani, S. C. Canobre, C. D. Garcia, R. A. A. Munoz, y E. M. Richter, «Use of pyrolyzed paper as disposable substrates for voltammetric determination of trace metals», *Talanta*, vol. 165, n.º November 2016, pp. 33-38, 2016.
- [140] Z. Wang, L. Li, y E. Liu, «Graphene ultrathin film electrodes modified with bismuth nanoparticles and polyaniline porous layers for detection of lead and cadmium ions in acetate buffer solutions», *Thin Solid Films*, vol. 544, pp. 362-367, 2013.
- [141] K. Koirala, J. H. Santos, A. L. Tan, M. A. Ali, y A. H. Mirza, «Chemically modified carbon paste electrode for the detection of lead, cadmium and zinc ions», *Sens. Rev.*, vol. 36, n.º 4, 2016.
- [142] P. A. Dimovasilis y M. I. Prodromidis, «Preparation of Screen-Printed Compatible Bismuth-Modified Sol-Gel Microspheres: Application to the Stripping Voltammetric Determination of Lead and Cadmium», *Anal. Lett.*, vol. 49, n.º 7, pp. 979-989, 2016.
- [143] L. Pikna, M. Heželová, y Z. Kováčová, «Optimization of simultaneous electrochemical determination of Cd(II), Pb(II), Cu(II) and Hg(II) at carbon nanotube-modified graphite electrodes.», *J. Environ. Sci. Heal. Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.*, vol. 50, n.º 8, pp. 874-881, 2015.

- [144] J. Mettakoonpitak, J. Mehaffy, J. Volckens, y C. S. Henry, «AgNP/Bi/Nafion-modified Disposable Electrodes for Sensitive Zn(II), Cd(II), and Pb(II) Detection in Aerosol Samples», *Electroanalysis*, n.º Ii, pp. 1-11, 2016.
- [145] W. Wonsawat, W. Dungchai, S. Motomizu, S. Chuanuwatanakul, y O. Chailapakul, «Highly sensitive determination of cadmium and lead using a low-cost electrochemical flow-through cell based on a carbon paste electrode.», *Anal. Sci.*, vol. 28, n.º 2, pp. 141-6, 2012.
- [146] M. Medina-Sánchez, M. Cadevall, J. Ros, y A. Merkoci, «Eco-friendly electrochemical lab-on-paper for heavy metal detection», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n.º 28, pp. 8445-8449, 2015.
- [147] C. Kokkinos, A. Economou, y I. Raptis, «Microfabricated disposable lab-on-a-chip sensors with integrated bismuth microelectrode arrays for voltammetric determination of trace metals», *Anal. Chim. Acta*, vol. 710, pp. 1-8, 2012.
- [148] P. A. Dimovasilis y M. I. Prodromidis, «Bismuth-dispersed xerogel-based composite films for trace Pb(II) and Cd(II) voltammetric determination», *Anal. Chim. Acta*, vol. 769, pp. 49-55, 2013.
- [149] V. Sosa, C. Barceló, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, y M. Esteban, «Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples», *Anal. Chim. Acta*, vol. 855, pp. 34-40, 2015.
- [150] C. Hao, Y. Shen, J. Shen, K. Xu, X. Wang, Y. Zhao, y C. Ge, «A glassy carbon electrode modified with bismuth oxide nanoparticles and chitosan as a sensor for Pb(II) and Cd(II)», *Microchim. Acta*, vol. 183, n.º 6, pp. 1823-1830, 2016.

- [151] D. Jedryczko, P. Pohl, y M. Welna, «Determination of the total cadmium, copper, lead and zinc concentrations and their labile species fraction in apple beverages by flow-through anodic stripping chronopotentiometry», *Food Chem.*, vol. 225, pp. 220-229, 2017.
- [152] S. Badui Dergal, *Química de los Alimentos*, Quinta. México: Pearson Educación, 2012.
- [153] L. Serra Majem y J. Aranceta Bartrina, *Nutrición y Salud Pública: métodos, bases científicas y aplicaciones*, Segunda. Barcelona: Elsevier, 2013.
- [154] Á. Gil Hernández y F. Sánchez de Medina Contreras, *Tratado de Nutrición. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*, Segunda. Madrid: Médica Panamericana, 2010.
- [155] B. A. Bowman y R. M. Russell, Eds., *Conocimientos Actuales sobre nutrición*, Octava., n.º 592. Washington DC.: Organización Panamericana de la Salud, 2003.
- [156] A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, y J. F. Van Bocxlaer, Eds., *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, Tercera. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- [157] D. Lexa y J. M. Saveant, «The Electrochemistry of Vitamin B12», *Acc. Chem. Res.*, vol. 16, pp. 235-243, 1983.
- [158] R. R. Eitenmiller y W. O. Landen Jr, *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. CRC Press, 1998.
- [159] J. M. Katzen, H M and Buchanan, «Enzymatic Synthesis of the Methyl Group of Methionine», *J. Biol. Chem.*, vol. 240, n.º 2, pp. 825-835, 1965.
- [160] H.-X. Wang, «Vitamin B12, folate, and Alzheimer's disease», *Drug Dev. Res.*, vol. 56, n.º 2, pp. 111-122, 2002.
- [161] S. P. Stabler, «Vitamin B12 Deficiency», *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, n.º 2, pp. 149-160, 2013.

- [162] W. Herrmann y R. Obeid, «Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency.», *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 105, n.º 40, pp. 680-5, 2008.
- [163] J. Zempleni, R. B. Rucker, D. B. McCormick, y J. W. Suttie, Eds., *Handbook of Vitamins*, Cuarta. CRC Press, 2007.
- [164] S. S. Kumar, R. S. Chouhan, y M. S. Thakur, «Trends in analysis of vitamin B12.», *Anal. Biochem.*, vol. 398, n.º 2, pp. 139-49, mar. 2010.
- [165] B. A. Cooper, «Studies with a more rapid method of vitamin B12 assay utilizing *Euglena Gracilis*», *J. clin Path*, vol. 12, p. 153, 1959.
- [166] L. S. Selvakumar, K. V. Ragavan, K. S. Abhijith, y M. S. Thakur, «Immunodipstick based gold nanosensor for vitamin B12 in fruit and energy drinks», *Anal. Methods*, vol. 5, n.º 7, pp. 1806-1810, 2013.
- [167] D. Kong, L. Liu, S. Song, H. Kuang, y C. Xu, «Development of Sensitive, Rapid, and Effective Immunoassays for the Detection of Vitamin B12 in Fortified Food and Nutritional Supplements», *Food Anal. Methods*, 2016.
- [168] D. Hampel, S. Shahab-Ferdows, J. M. Domek, T. Siddiqua, R. Raqib, y L. H. Allen, «Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk», *Food Chem.*, vol. 153, pp. 60-65, 2014.
- [169] F. Watanabe, Y. Nakano, E. Stupperich, K. Ushikoshi, S. Ushikoshi, I. Ushikoshi, y S. Kitaoka, «A radioisotope dilution method for quantitation of total vitamin B12 in biological sample using isolated *Euglena* pellicle fragments as a solid-phase vitamin B12-binding material.», *Anal Chem*, vol. 65, p. 657, 1993.
- [170] W. Qin, Z. Zhang, y H. Liu, «Chemiluminescence flow sensor

- for the determination of vitamin B12», vol. 357, 1997.
- [171] N. Akbay y E. Gök, «Determination of vitamin B12 using a chemiluminescence flow system», *J. Anal. Chem.*, vol. 63, n.º 11, pp. 1073-1077, 2008.
- [172] H. Karsilayan, «Quantitation of vitamin B12 by first-derivate absorption spectroscopy», *Spectrochim. Acta*, vol. 52, n.º 9, p. 1163, 1996.
- [173] B. Morelli, «High-resolution/higher-order derivative spectrophotometry for determination of ternary mixtures of B-complex vitamins in pharmaceuticals», *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 354, n.º 1, pp. 97-102, 1996.
- [174] M. M. Delgado-Zamarreño, I. González-Maza, A. Sánchez-Pérez, y R. Carabias-Martinez, «Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography», *J. Chromatogr. A*, vol. 953, n.º 1-2, pp. 257-262, 2002.
- [175] K. Akatsuka y I. Atsuya, «Determination of vitamin B12 as cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry using the solid sampling technique», *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 335, pp. 200–204, 1989.
- [176] D. C. da Silva, J. V. Visentainer, N. E. de Souza, y C. C. Oliveira, «Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of the Ten Water-Soluble Vitamins in Food Supplements», *Food Anal. Methods*, vol. 6, n.º 6, pp. 1592-1606, 2013.
- [177] C. Siva, K. Raju, L. L. Yu, J. E. Schiel, y S. E. Long, «A simple and sensitive LC-ICP-MS method for the accurate determination of vitamin B12 in fortified breakfast cereals and multivitamin tablets», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 28, pp. 901-907, 2013.

- [178] M. Amin y J. Reusch, «High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins II. Simultaneous determinations of vitamins B1, B2, B6 and B12 in pharmaceutical preparations», *J. Chromatogr.*, vol. 390, pp. 448-453, 1987.
- [179] P. Chen, W. R. Wolf, I. Castanheira, y A. Sanches-Silva, «A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB12) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clean-up», *Anal. Methods*, vol. 2, n.º 8, p. 1171, 2010.
- [180] X. Luo, B. Chen, L. Ding, F. Tang, y S. Yao, «HPLC-ESI-MS analysis of Vitamin B12 in food products and in multivitamins-multimineral tablets», *Anal. Chim. Acta*, vol. 562, n.º 2, pp. 185-189, 2006.
- [181] S. M. Mandal, M. Mandal, A. K. Ghosh, y S. Dey, «Rapid determination of vitamin B2 and B12 in human urine by isocratic liquid chromatography», *Anal. Chim. Acta*, vol. 640, pp. 110-113, 2009.
- [182] S. Antakli, N. Sarkees, y T. Sarraf, «Determination of Water-Soluble Vitamins B1, B2, B3, B6, B9, B12 and C on ODS Column 5 µm by High Performance Liquid Chromatography with UV-DAD Detection», *Asian J. Chem.*, vol. 26, n.º 20, pp. 7035-7039, 2014.
- [183] M. Okbami y S. A. Sado-Wilhelmy, «A new method for the determination of Vitamin B12 in seawater», *Anal. Chim. Acta*, vol. 517, n.º 1-2, pp. 33-38, 2004.
- [184] L. González, G. Yuln, y M. G. Volonté, «Determination of cyanocobalamin, betamethasone, and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 20, n.º 3, pp. 487-492, 1999.

- [185] C. K. Markopoulou, K. A. Kagkadis, y J. E. Koundourellis, «An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, n.º 4, pp. 1403-1410, 2002.
- [186] M. Nakos, I. Pepelanova, S. Beutel, U. Krings, R. G. Berger, y T. Scheper, «Isolation and analysis of vitamin B<sub>12</sub> from plant samples», *Food Chem.*, vol. 216, pp. 301-308, 2017.
- [187] E. C. Marley, E. Mackay, y G. Young, «Characterisation of vitamin B<sub>12</sub> immunoaffinity columns and method development for determination of vitamin B<sub>12</sub> in a range of foods, juices and pharmaceutical products using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with UV detecti», *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 26, n.º 3, pp. 282-288, 2009.
- [188] P. F. Chatzimichalakis, V. F. Samanidou, R. Verpoorte, y I. N. Papadoyannis, «Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction», *J. Sep. Sci.*, vol. 27, n.º 14, pp. 1181-1188, 2004.
- [189] F. Qu, Q. Song, y J. You, «Rapid determination of vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) based on silver nanoclusters capped by polyethyleneimine with different molecular weights and terminal groups», *Anal. Methods*, vol. 8, n.º 22, pp. 4324-4327, 2016.
- [190] J. Gholami, M. Manteghian, A. Badiei, M. Javanbakht, y H. Ueda, «Label free Detection of Vitamin B<sub>12</sub> Based on Fluorescence Quenching of Graphene Oxide Nanolayer», *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures*, vol. 23, pp.

- 878-884, 2015.
- [191] A. H. Gore, M. B. Kale, P. V. Anbhule, S. R. Patil, y G. B. Kolekar, «A novel FRET probe for selective and sensitive determination of vitamin B12 by functionalized CdS QDs in aqueous media: applications to pharmaceutical and biomedical analysis», *RSC Adv.*, vol. 4, n.º 2, p. 683, 2014.
- [192] A. I. Radu, M. Kuellmer, B. Giese, U. Huebner, K. Weber, D. Cialla-May, y J. Popp, «Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) in food analytics: Detection of vitamins B2 and B12 in cereals», *Talanta*, vol. 160, pp. 289-297, 2016.
- [193] H. P. Hogenkamp y S. Holmes, «Polarography of cobalamins and cobinamides.», *Biochemistry*, vol. 9, n.º 9, pp. 1886-92, 1970.
- [194] P. G. Swetik y D. G. Brown, «Cyclic voltammetric study of vitamin B12 derivatives», *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 51, pp. 433-439, 1974.
- [195] D. Lexa y J. M. Saveant, «Electrochemistry of vitamin B12. I. Role of the base-on/base-off reaction in the oxidoreduction mechanism of the B12r-B12s system», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, n.º 9, pp. 2652-2658, 1976.
- [196] D. Lexa y J. M. Saveant, «Electrochemistry of vitamin B12. 3. One-electron intermediates in the reduction of methylcobalamin and methylcobinamide», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 100, n.º 10, pp. 3220-3222, 1978.
- [197] D. Lexa, J. M. Saveant, y J. Zickler, «Electrochemistry of Vitamin B12. 6. Diaquocobinamide», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, n.º 12, pp. 4851-4852, 1980.
- [198] D. Lexa, J. M. Savant, y J. Zickler, «Electrochemistry of Vitamin B 12. 5. Cyanocobalamins», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, n.º 8, pp. 2654-2663, 1980.

- [199] D. Faure, D. Lexa, y J. M. Saveant, «Electrochemistry of Vitamin B12. Part VII. Role of the Base-off/Base-on reaction in the oxido-reduction in the B12r-B12s couple in non-aqueous solvents», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 140, pp. 269-284, 1982.
- [200] D. Faure, D. Lexa, y J. M. Saveant, «Electrochemistry of Vitamin B12. Part VIII. Thermodynamic and kinetic trans-effects in B12r-B12s oxido-reduction», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 140, pp. 285-295, 1982.
- [201] D. Faure, D. Lexa, y J. M. Saveant, «Electrochemistry of Vitamin B12. Part IX. The Co(III)/Co(II) Couple in Non-Aqueous Solvents», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 140, n.º 2, pp. 297-309, 1982.
- [202] D. Zheng y T. Lu, «Electrochemical reactions of cyanocobalamin in acidic media», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 429, n.º 1-2, pp. 61-65, may 1997.
- [203] J. H. Zagal, M. J. Aguirre, y M. A. Páez, «O<sub>2</sub> reduction kinetics on a graphite electrode modified with adsorbed vitamin B12», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 437, pp. 45-52, 1997.
- [204] Y. Hisaeda, T. Nishioka, Y. Inoue, K. Asada, y T. Hayashi, «Electrochemical reactions mediated by vitamin B12 derivatives in organic solvents», *Coord. Chem. Rev.*, vol. 198, pp. 21-37, 2000.
- [205] K. Ariga, K. Tanaka, K. Katagiri, J. Kikuchi, H. Shimakoshi, E. Ohshima, y Y. Hisaeda, «Langmuir monolayer of organoalkoxysilane for vitamin B12-modified electrode», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 3, n.º 16, pp. 3442-3446, 2001.
- [206] S. R. Hernández, G. G. Ribero, y H. C. Goicoechea,

- «Enhanced application of square wave voltammetry with glassy carbon electrode coupled to multivariate calibration tools for the determination of B6 and B12 vitamins in pharmaceutical preparations», *Talanta*, vol. 61, pp. 743-753, 2003.
- [207] P. Tomčík, C. E. Banks, T. J. Davies, y R. G. Compton, «A Self-Catalytic Carbon Paste Electrode for the Detection of Vitamin B 12», *Anal. Chem.*, vol. 76, n.º 1, pp. 161-165, 2004.
- [208] H. Shimakoshi, M. Tokunaga, K. Kuroiwa, N. Kimizuka, y Y. Hisaeda, «Preparation and electrochemical behaviour of hydrophobic vitamin B(12) covalently immobilized onto platinum electrode.», *Chem. Commun. (Camb)*, pp. 50-51, 2004.
- [209] T. J. Davies, A. C. Garner, S. G. Davies, y R. G. Compton, «Cyclic voltammetry at microdroplet modified electrodes. A comparison of the reaction of vicinal dibromides with vitamin B12s at the liquid/liquid interface with the corresponding homogeneous process: Evidence for polar-solvent effects at the liquid/liquid», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 570, n.º 2, pp. 171-185, 2004.
- [210] N. Yang, Q. Wan, y X. Wang, «Voltammetry of Vitamin B 12 on a thin self-assembled monolayer modified electrode», *Electrochim. Acta*, vol. 50, n.º 11, pp. 2175-2180, 2005.
- [211] M. C. Lagunas, D. S. Silvester, L. Aldous, y R. G. Compton, «The Electrochemistry of Vitamin B12 in Ionic Liquids and Its Use in the Electrocatalytic Reduction of Vicinal Dibromoalkanes», *Electroanalysis*, vol. 18, n.º 22, pp. 2263-2268, 2006.
- [212] S. Dong, L. Chi, P. He, Q. Wang, y Y. Fang, «Simultaneous determination of antioxidants at a chemically modified

- electrode with vitamin B12 by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection», *Talanta*, vol. 80, n.º 2, pp. 809-814, 2009.
- [213] F. Kuralay, T. Vural, C. Bayram, E. B. Denkbas, y S. Abaci, «Carbon nanotube–chitosan modified disposable pencil graphite electrode for Vitamin B12 analysis», *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 87, pp. 18-22, 2011.
- [214] M. R. Shishehbore, «Simultaneous Voltammetric Determination of Vitamine B9 and B12 using a Hydroquinone Derivative Multi-Wall Carbon Nanotubes Paste Electrode», *Orient. J. Chem.*, vol. 29, n.º 2, pp. 597-602, 2013.
- [215] M. Ovalle, E. Arroyo, M. Stoytcheva, R. Zlatev, L. Enriquez, y A. Olivas, «An amperometric microbial biosensor for the determination of vitamin B 12», *Anal. Methods*, vol. 7, n.º 19, pp. 8185-8189, 2015.
- [216] W. Cheng y R. G. Compton, «Oxygen Reduction Mediated by Single Nanodroplets Containing Attomoles of Vitamin B12: Electrocatalytic Nano-Impacts Method», *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 54, n.º 24, pp. 7082-7085, 2015.
- [217] N. Martins, C. Lobo Roriz, P. Morales, L. Barros, y I. C. F. R. Ferreira, «Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 52, pp. 1-15, 2016.
- [218] UE, «Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios». pp. 1-339, 2008.
- [219] M. Oplatońska-Stachowiak y C. T. Elliott, «Food Colours: Existing and Emerging Food Safety Concerns», *Crit. Rev.*

- Food Sci. Nutr.*, vol. 8398, n.º November, pp. 00-00, 2015.
- [220] UE, «Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.» pp. 1-177, 2011.
- [221] P. Amchova, H. Kotolova, y J. Ruda-Kucerova, «Health safety issues of synthetic food colorants», *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 73, n.º 3, pp. 914-922, 2015.
- [222] B. G. Wilson y S. L. Bahna, «Adverse reactions to food additives.», *Ann. allergy, asthma Immunol.*, vol. 95, pp. 499-507, 2005.
- [223] F. Z. Mazdeh, A. R. Khorrami, Z. Moradi-Khatoonabadi, F. E. Aftabdari, M. R. S. Ardekani, G. Moghaddam, y M. Hajimahmoodi, «Determination of 8 synthetic food dyes by solid phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography», *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 15, n.º 1, pp. 173-181, 2016.
- [224] K. S. Minioti, C. F. Sakellariou, y N. S. Thomaidis, «Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector», *Anal. Chim. Acta*, vol. 583, n.º 1, pp. 103-110, 2007.
- [225] S. P. Alves, D. M. Brum, É. C. Branco de Andrade, y A. D. Pereira Netto, «Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection», *Food Chem.*, vol. 107, n.º 1, pp. 489-496, 2008.
- [226] Y. Shen, X. Zhang, W. Prinyawiwatkul, y Z. Xu, «Simultaneous determination of red and yellow artificial

- food colourants and carotenoid pigments in food products», *Food Chem.*, vol. 157, pp. 553-558, 2014.
- [227] B. Tang, C. Xi, Y. Zou, G. Wang, X. Li, L. Zhang, D. Chen, y J. Zhang, «Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 960, pp. 87-91, 2014.
- [228] W. De Araújo Siqueira Bento, B. P. Lima, y A. P. S. Paim, «Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC», *Food Chem.*, vol. 183, pp. 154-160, 2015.
- [229] A. Benvidi, S. Abbasi, S. Gharaghani, M. Dehghan Tezerjani, y S. Masoum, «Spectrophotometric determination of synthetic colorants using PSO-GA-ANN», *Food Chem.*, vol. 220, pp. 377-384, 2017.
- [230] F. Turak y M. U. Ozgur, «Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of food colorants and sweeteners», *J. Chem.*, pp. 1-9, 2013.
- [231] K. Asadpour-Zeynali y S. Manafi-Khoshmanesh, «Simultaneous standard addition method for novel determination of components in a single step: application in analysis of Sunset yellow and Carmoisine by a spectrophotometric technique», *Anal. Methods*, vol. 6, n.º 15, pp. 6110-6115, 2014.
- [232] Y. Ni y X. Gong, «Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants», *Anal. Chim. Acta*, vol. 354, n.º 1-3, pp. 163-171, 1997.
- [233] K. Hofer y D. Jenewein, «Quick spectrophotometric identification of synthetic food colorants by linear regression analysis», *Z. Leb. Unters Forsch A*, vol. 204, n.º 1, pp. 32-38, 1997.

- [234] J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, M. J. Villaseñor Llerena, y N. Rodríguez Fariñas, «Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of Tartrazine, Quinoline Yellow and Patent Blue V in commercial products», *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 365, n.º 4, pp. 383-388, 1999.
- [235] Y. Ni, M. Qi, y S. Kokot, «Simultaneous Spectrophotometric Determination of Ternary Mixtures of Tartrazine, Sunset Yellow, and Ponceau 4R By H-Point Standard Addition Method», *Anal. Lett.*, vol. 34, n.º 14, pp. 2585-2596, 2001.
- [236] H. Langhals, «The rapid identification of organic colorants by UV / vis spectroscopy», *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 573-578, 2002.
- [237] R. Sahraei, A. Farmany, y S. S. Mortazavi, «A nanosilver-based spectrophotometry method for sensitive determination of tartrazine in food samples», *Food Chem.*, vol. 138, n.º 2-3, pp. 1239-1242, 2013.
- [238] S. Antakli, L. Nejem, y S. Katran, «Simultaneous determination of tartrazine and brilliant blue in foodstuffs by spectrophotometric method», *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 7, n.º 6, pp. 214-218, 2015.
- [239] U. Uhlemann, K. K. Strelau, K. Weber, P. A. Da Costa Filho, P. Rosch, y J. Popp, «Raman spectroscopic determination of norbixin and tartrazine in sugar.», *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, vol. 29, n.º 8, pp. 1244-1255, 2012.
- [240] N. Peica, I. Pavel, S. Cîntă Pînzaru, V. K. Rastogi, y W. Kiefer, «Vibrational characterization of E102 food additive by Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy and theoretical studies», *J. Raman Spectrosc.*, vol. 36, n.º 6-7, pp. 657-666, 2005.

- [241] J. Meng, S. Qin, L. Zhang, y L. Yang, «Designing of a novel gold nanodumbbells SERS substrate for detection of prohibited colorants in drinks», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 366, pp. 181-186, 2016.
- [242] Y. Xie, Y. Li, L. Niu, H. Wang, H. Qian, y W. Yao, «A novel surface-enhanced Raman scattering sensor to detect prohibited colorants in food by graphene/silver nanocomposite», *Talanta*, vol. 100, pp. 32-37, 2012.
- [243] K. Asadpour-Zeynali y S. Manafi-Khoshmanesh, «Simultaneous Spectrophotometric Determination of Sunset Yellow and Quinoline Yellow in a Single Step», *J. Chinese Chem. Soc.*, vol. 62, n.º 9, pp. 772-779, 2015.
- [244] H. Xu, X. Yang, G. Li, C. Zhao, y X. Liao, «Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots for Selective Detection of Tartrazine in Food Samples», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, n.º 30, pp. 6707-6714, 2015.
- [245] S. Chanlon, L. Joly-Pottuz, M. Chatelut, O. Vittori, y J. L. Cretier, «Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography», *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, n.º 6, pp. 503-515, 2005.
- [246] Z. Wang, H. Zhang, Z. Wang, J. Zhang, X. Duan, J. Xu, y Y. Wen, «Trace analysis of Ponceau 4R in soft drinks using differential pulse stripping voltammetry at SWCNTs composite electrodes based on PEDOT:PSS derivatives», *Food Chem.*, vol. 180, pp. 186-193, 2015.
- [247] Y. Zhang, L. Hu, X. Liu, B. Liu, y K. Wu, «Highly-sensitive and rapid detection of ponceau 4R and tartrazine in drinks using alumina microfibers-based electrochemical sensor», *Food Chem.*, vol. 166, pp. 352-357, 2015.

- [248] X. Yang, H. Qin, M. Gao, y H. Zhang, «Simultaneous detection of Ponceau 4R and tartrazine in food using adsorptive stripping voltammetry on an acetylene black nanoparticle-modified electrode», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 91, n.º 15, pp. 2821-2825, 2011.
- [249] X. Qiu, L. Lu, J. Leng, Y. Yu, W. Wang, M. Jiang, y L. Bai, «An enhanced electrochemical platform based on graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes nanocomposite for sensitive determination of Sunset Yellow and Tartrazine», *Food Chem.*, vol. 190, pp. 889-895, 2016.
- [250] J. Zhang, M. Wang, C. Shentu, W. Wang, y Z. Chen, «Simultaneous determination of the isomers of Ponceau 4R and Amaranth using an expanded graphite paste electrode», *Food Chem.*, vol. 160, pp. 11-15, 2014.
- [251] Y. Zhang, X. Zhang, X. Lu, J. Yang, y K. Wu, «Multi-wall carbon nanotube film-based electrochemical sensor for rapid detection of Ponceau 4R and Allura Red», *Food Chem.*, vol. 122, n.º 3, pp. 909-913, 2010.
- [252] M. Florian, H. Yamanaka, P. A. Carneiro, y M. V. B. Zanoni, «Determination of brilliant blue FCF in the presence and absence of erythrosine and quinoline yellow food colours by cathodic stripping voltammetry.», *Food Addit. Contam.*, vol. 19, n.º 9, pp. 803-809, 2002.
- [253] S. M. Ghoreishi, M. Behpour, y M. Golestaneh, «Simultaneous voltammetric determination of Brilliant Blue and Tartrazine in real samples at the surface of a multi-walled carbon nanotube paste electrode», *Anal. Methods*, vol. 3, n.º 12, p. 2842, 2011.
- [254] Y. Ni, J. Bai, y L. Jin, «Simultaneous adsorptive voltammetric analysis of mixed colorants by multivariate

- calibration approach», *Anal. Chim. Acta*, vol. 329, n.º 1-2, pp. 65-72, 1996.
- [255] Y. Ni y J. Bai, «Simultaneous determination of Amaranth and Sunset Yellow by ratio derivative voltammetry», *Talanta*, vol. 44, n.º 1, pp. 105-109, 1997.
- [256] J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, y M. J. Villaseñor Llerena, «Square wave adsorptive determination of sunset yellow», *Talanta*, vol. 44, n.º 96, pp. 467-474, 1997.
- [257] S. Combeau, M. Chatelut, y O. Vittori, «Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: Application to soft drinks», *Talanta*, vol. 56, n.º 1, pp. 115-122, 2002.
- [258] M. L. S. Silva, M. B. Q. Garcia, J. L. F. C. Lima, y E. Barrado, «Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system», *Talanta*, vol. 72, n.º 1, pp. 282-288, 2007.
- [259] A. Królicka, A. Bobrowski, J. Zaregonekbski, y I. Tesarowicz, «Bismuth film electrodes for adsorptive stripping voltammetric determination of sunset yellow FCF in soft drinks», *Electroanalysis*, vol. 26, n.º 4, pp. 756-765, 2014.
- [260] E. Desimoni, B. Brunetti, y M. S. Cosio, «Determination of Patent Blue V (E131) at a Nafion-modified glassy carbon electrode», *Electroanalysis*, vol. 18, n.º 3, pp. 231-235, 2006.
- [261] T. Gan, J. Sun, S. Cao, F. Gao, Y. Zhang, y Y. Yang, «One-step electrochemical approach for the preparation of graphene wrapped-phosphotungstic acid hybrid and its application for simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine», *Electrochim. Acta*, vol. 74, pp. 151-157,

- 2012.
- [262] Y. Z. Song, J. M. Xu, J. S. Lv, H. Zhong, Y. Ye, y J. M. Xie, «Electrochemical reduction of tartrazine at multi-walled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode», *Russ. J. Phys. Chem. A*, vol. 86, n.º 2, pp. 303-310, 2012.
- [263] R. A. Medeiros, B. C. Lourencao, R. C. Rocha-Filho, y O. Fatibello-Filho, «Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode», *Talanta*, vol. 97, pp. 291-297, 2012.
- [264] R. A. Medeiros, B. C. Lourencao, R. C. Rocha-Filho, y O. Fatibello-Filho, «Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode», *Talanta*, vol. 99, pp. 883-889, 2012.
- [265] S. M. Ghoreishi, M. Behpour, y M. Golestaneh, «Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode», *Food Chem.*, vol. 132, n.º 1, pp. 637-641, 2012.
- [266] M. Gómez, V. Arancibia, C. Rojas, y E. Nagles, «Adsorptive stripping voltammetric determination of tartrazine and sunset yellow in gelatins and soft drink powder in the presence of cetylpyridinium bromide», *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, n.º 8, pp. 7493-7502, 2012.
- [267] P. Sierra-Rosales, C. Toledo??Neira, y J. A. Squella, «Electrochemical determination of food colorants in soft drinks using MWCNT-modified GCEs», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 240, pp. 1257-1264, 2017.
- [268] T. Gan, J. Sun, H. Zhu, J. Zhu, y D. Liu, «Synthesis and

- characterization of graphene and ordered mesoporous TiO<sub>2</sub> as electrocatalyst for the determination of azo colorants», *J. Solid State Electrochem.*, vol. 17, n.º 8, pp. 2193-2201, 2013.
- [269] X. Ye, Y. Du, D. Lu, y C. Wang, «Fabrication of  $\beta$ -cyclodextrin-coated poly (diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene composite film modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous electrochemical determination colorants of sunset yello», *Anal. Chim. Acta*, vol. 779, pp. 22-34, 2013.
- [270] T. Gan, J. Sun, Q. Wu, Q. Jing, y S. Yu, «Graphene decorated with nickel nanoparticles as a sensitive substrate for simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine in food samples», *Electroanalysis*, vol. 25, n.º 6, pp. 1505-1512, 2013.
- [271] L. Zhao, B. Zeng, y F. Zhao, «Electrochemical determination of tartrazine using a molecularly imprinted polymer - Multiwalled carbon nanotubes - ionic liquid supported Pt nanoparticles composite film coated electrode», *Electrochim. Acta*, vol. 146, pp. 611-617, 2014.
- [272] X. Song, Z. Shi, X. Tan, S. Zhang, G. Liu, y K. Wu, «One-step solvent exfoliation of graphite to produce a highly-sensitive electrochemical sensor for tartrazine», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 197, pp. 104-108, 2014.
- [273] M. Wang, Y. Gao, Q. Sun, y J. Zhao, «Ultrasensitive and simultaneous determination of the isomers of Amaranth and Ponceau 4R in foods based on new carbon nanotube/polypyrrole composites», *Food Chem.*, vol. 172, pp. 873-879, 2015.
- [274] M. Wang y J. Zhao, «Facile synthesis of Au supported on ionic liquid functionalized reduced graphene oxide for

- simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in drinks», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 216, pp. 578-585, 2015.
- [275] J. Wang, B. Yang, H. Wang, P. Yang, y Y. Du, «Highly sensitive electrochemical determination of Sunset Yellow based on gold nanoparticles/graphene electrode», *Anal. Chim. Acta*, vol. 893, pp. 41-48, 2015.
- [276] D. Sun, C. Xu, J. Long, y T. Ge, «Determination of Sunset Yellow using a carbon paste electrode modified with a nanostructured resorcinol-formaldehyde resin», *Microchim. Acta*, vol. 182, n.º 15-16, pp. 2601-2606, 2015.
- [277] Y. J. Yang y W. Li, «CTAB functionalized graphene oxide/multiwalled carbon nanotube composite modified electrode for the simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine», *Russ. J. Electrochem.*, vol. 51, n.º 3, pp. 218-226, 2015.
- [278] M. Arvand, Y. Parhizi, y S. H. Mirfathi, «Simultaneous Voltammetric Determination of Synthetic Colorants in Foods Using a Magnetic Core–Shell  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2/\text{MWCNTs}$  Nanocomposite Modified Carbon Paste Electrode», *Food Anal. Methods*, vol. 9, n.º 4, pp. 863-875, 2016.
- [279] S. M. Rovina, K.; Siddiquee, S.; Shaarani, «Highly sensitive determination of sunset yellow FCF (E110) in food products based on Chitosan/Nanoparticles/MWCNTs with modified gold electrode», *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 36, n.º 1, p. 12023, 2016.
- [280] L. Ji, Q. Cheng, K. Wu, y X. Yang, «Cu-BTC frameworks-based electrochemical sensing platform for rapid and simple determination of Sunset yellow and Tartrazine», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 231, pp. 12-17, 2016.

- [281] K. Deng, C. Li, X. Li, y H. Huang, «Simultaneous detection of sunset yellow and tartrazine using the nanohybrid of gold nanorods decorated graphene oxide», *J. Electroanal. Chem.*, vol. 780, pp. 296-302, 2016.
- [282] G. Karim-Nezhad, Z. Khorablou, M. Zamani, P. Seyed Dorraji, y M. Alamgholiloo, «Voltammetric sensor for tartrazine determination in soft drinks using poly (p-aminobenzenesulfonic acid)/zinc oxide nanoparticles in carbon paste electrode», *J. Food Drug Anal.*, pp. 1-9, 2016.
- [283] S. Jampasa, W. Siangproh, K. Duangmal, y O. Chailapakul, «Electrochemically reduced graphene oxide-modified screen-printed carbon electrodes for a simple and highly sensitive electrochemical detection of synthetic colorants in beverages», *Talanta*, vol. 160, pp. 113-124, 2016.
- [284] J. Li, X. Wang, H. Duan, Y. Wang, Y. Bu, y C. Luo, «Based on magnetic graphene oxide highly sensitive and selective imprinted sensor for determination of sunset yellow», *Talanta*, vol. 147, pp. 169-176, 2016.
- [285] J. Wang, B. Yang, K. Zhang, D. Bin, Y. Shiraishi, P. Yang, y Y. Du, «Highly sensitive electrochemical determination of Sunset Yellow based on the ultrafine Au-Pd and reduced graphene oxide nanocomposites», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 481, pp. 229-235, 2016.
- [286] A. E. Paramo, S. Palmero, A. Heras, A. Colina, y D. Ibañez, «Development of Disposable Carbon Nanofibers Electrodes Supported on Filters», *Electroanalysis*, vol. 28, n.º 4, pp. 890-897, 2016.
- [287] Statgraphics.net, «Statgraphics Centurion». .
- [288] J. Garoz-Ruiz, S. Palmero, D. Ibañez, a. Heras, y a. Colina, «Press-transfer optically transparent electrodes fabricated

- from commercial single-walled carbon nanotubes», *Electrochem. commun.*, vol. 25, pp. 1-4, nov. 2012.
- [289] J. V Macpherson, C. J. Slevin, y P. R. Unwin, «Probing the oxidative etching kinetics of metals with the feedback mode of the scanning electrochemical microscope», *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 92, n.º 20, pp. 3799-3805, 1996.
- [290] E. M. Diez, «Determinación de metales en un sistema automático de flujo por análisis potenciométrico de redisolución», Universidad de Burgos, 2000.
- [291] I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús, y V. Puentes, «Influence of the sequence of the reagents addition in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles», *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n.º 32, pp. 15752-15757, 2011.
- [292] P. Chen, W. R. Wolf, I. Castanheira, y A. Sanches-Silva, «A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB12) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clear-up», *Anal. methods*, vol. 2, pp. 1171-1175, 2010.
- [293] B. Elvers, Ed., *Ullmann's Food and Feed*, 3.<sup>a</sup> ed. Hamburgo, Alemania: Wiley-VCH, 2007.
- [294] T. E. Keyes y R. J. Forster, «Spectroelectrochemistry», en *Handbook of Electrochemistry*, n.º 2, C. G. Zoski, Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, pp. 591-635.
- [295] «R». Granada, España.