



Universidad
Zaragoza

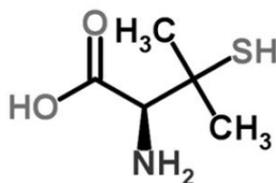
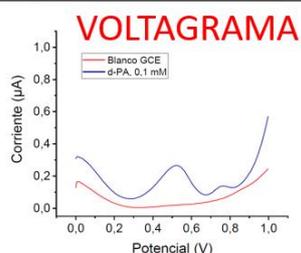


Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Biosensores para la detección y cuantificación de
contaminantes emergentes

CONTAMINANTES EMERGENTES



D-PA (ANTIBIÓTICO)

POTENCIOSTATO



ELECTRODOS VOLTAMÉTRICOS

AUTOR: Alfonso Gracia Ballesteros

DIRECTOR: Juan Carlos Vidal Ibáñez

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

Grado en Química

Convocatoria: Septiembre de 2019

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Experimental.....	5
2.1 Reactivos y disoluciones.....	5
2.2 Instrumentación	6
2.3 Procedimientos experimentales	7
2.3.1 Preparación de los electrodos	7
2.3.2 Caracterización de los electrodos	8
2.3.3 Modificaciones del electrodo de carbón vítreo	9
2.3.4 Cuantificación de D-Penicilamina con electrodos modificados y sin modificar	11
3. Resultados y discusión	12
3.1 Caracterización de electrodo de diamante dopado con boro y detección y cuantificación de D-Penicilamina	12
3.2 Caracterización de electrodo de carbón vítreo y detección y cuantificación de D-Penicilamina.....	15
3.3 Cuantificación de la D-Penicilamina con el electrodo de carbón vítreo modificado	18
3.4 Cuantificación de la D-Penicilamina con los electrodos metálicos de oro y platino	19
4. Conclusiones.....	20
5. Referencias bibliográficas	23
Abreviaturas empleadas en esta memoria	25

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la detección y cuantificación electroquímica de la D-Penicilamina (D-PA) mediante técnicas voltamétricas, empleando distintos electrodos de trabajo y observando las diferencias entre cada uno de ellos.

Los electrodos estudiados han sido: electrodo de diamante dopado con boro (BDD), electrodo de carbón vítreo (GC) y electrodos de disco de oro y platino. También se llevaron a cabo modificaciones del electrodo GC con distintas dispersiones como nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs), nanopartículas de oro (AuNPs) y grafeno en su forma oxidada y reducida (GO/rGO) para mejorar la electrocatálisis y la velocidad de transferencia de carga (VTC) de las mismas en la determinación del antibiótico. Para estas modificaciones se añadía 5 μL de la dispersión en la superficie del electrodo y posteriormente se secaba la gota con una corriente de N_2 .

La primera parte de la memoria se centra en la caracterización de los electrodos BDD y GC mediante dos ensayos; uno para conocer la ventana de potencial de los mismos y el otro mediante una disolución de ferrocianuro para comprobar el estado de los electrodos a través de la separación entre los picos. Algunos de estos ensayos se realizaron con un pretratamiento con H_2SO_4 o aplicando un potencial negativo durante 3 ó 30 minutos con el objetivo de mejorar los resultados.

Posteriormente se realizaron las medidas del antibiótico en una disolución de tampón fosfato 0,1 M (pH = 7). La técnica utilizada fue la voltametría de pulso diferencial (DPV), la cual es una técnica muy sensible para la caracterización electroquímica, utilizándose también la técnica de voltametría cíclica. Se obtiene un pico de oxidación a potenciales entre 0,4-0,7 V. Se observaron diferencias entre los distintos electrodos utilizados; siendo el GC sin modificar (*GC bare*) el electrodo con el que se obtuvieron mejores resultados.

Por último, se estudiaron también algunas propiedades analíticas en la determinación de la D-PA como la reproducibilidad, el límite de detección o el rango lineal de alguno de los electrodos de trabajo utilizados a lo largo del trabajo experimental. Otro estudio que se realizó fue el tiempo de vida de las modificaciones de los electrodos; es decir, cuántas veces puede ser utilizado el electrodo modificado sin que se pierdan las propiedades analíticas del mismo.

El objetivo de este trabajo es observar las diferencias de los diferentes electrodos en la detección y cuantificación mediante técnicas electroquímicas de disoluciones de distintas concentraciones de antibiótico (0,01-0,75 mM) y poder decidir cuál es el más adecuado para nuestro propósito.

Los resultados obtenidos permiten la detección y cuantificación de la D-Penicilamina de una forma rápida y precisa, obteniendo un límite de detección de 4,11 μM y un rango lineal de 0,014-0,75 mM en el caso del *GC bare*. La reproducibilidad fue buena en

todos los casos, estando siempre la desviación estándar relativa (%DSR) por debajo del 10%.

Abstract

This work has studied the electrochemical detection and quantification of D-Penicillamine (D-PA) using voltametric techniques, using different working electrodes and observing the differences between each of them.

The electrodes studied have been: boron-doped diamond electrode (BDD), vitreous carbon electrode (GC) and gold and platinum disc electrodes. Modifications of the GC electrode were also carried out with different dispersions such as multilayer carbon nanotubes (MWCNTs), gold nanoparticles (AuNPs) and graphene in their oxidized and reduced form (GO/rGO) to improve electrocatalysis and the speed of load transfer (VTC) of these in the determination of the antibiotic. For these modifications, 5 μ L of the dispersion on the surface of the electrode was added and then the droplet was dried with a current of N_2 .

The first part of the memory focuses on the characterization of BDD and GC electrodes by two tests; one to know the potential window of the same and the other by a solution of ferrocyanide to check the status of the electrodes through the separation between the peaks. Some of these tests were performed with pretreatment with H_2SO_4 or applying a negative potential for 3 or 30 minutes with the aim of improving the results.

Subsequently, the antibiotic measures were performed in a phosphate buffer 0.1 M (pH = 7). The technique used was differential pulse voltametry (DPV), which is a very sensitive technique for electrochemical characterization, also using the cyclic voltametry technique. A peak of oxidation is obtained at potentials between 0.4-0.7 V. Differences were observed between the different electrodes used; the unmodified GC (*GC bare*) was the electrode with which the best results were obtained.

Finally, some analytical properties in the determination of D-PA such as reproducibility, detection limit or linear range of some of the working electrodes used throughout experimental work were also studied. Another study was the lifetime of electrode modifications; that is, how many times the modified electrode can be used without losing the analytical properties of it.

The objective of this work is to observe the differences of the different electrodes in the detection and quantification using electrochemical techniques of solutions of different concentrations of antibiotic (0.01-0.75 mM) and to be able to decide which is the most appropriate for our purpose.

The results obtained allow the detection and quantification of D-Penicillamine in a fast and accurate manner, obtaining a detection limit of 4.11 M and a linear range of 0.014-0.75 mM in the case of the GC *bare*. Reproducibility was good in all cases, with the relative standard deviation (%DSR) always below 10%.

1. Introducción

En la actualidad, el interés por conocer el efecto que tienen en el medioambiente los denominados contaminantes emergentes está aumentando considerablemente. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) define un contaminante emergente como un “compuesto químico o un material que se caracteriza porque se percibe como un peligro potencial o real para la salud humana o el medioambiente o no están establecidos sus efectos sobre la salud” [1]. Un aspecto de gran relevancia a tener en cuenta respecto a los contaminantes emergentes es la escasez de regulación oficial, lo que provoca la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el control de los mismos. En cuanto a los principales tipos de CE, estos se clasifican en: pesticidas polares, retardantes de llamas bromados, parafinas cloradas, compuestos perfluorados, fármacos, productos de higiene personal y drogas [2]. Las vías de contaminación de los mismos son mayoritariamente el agua, suelo o aire, siendo el agua la más importante de todas las mencionadas [1].

Estos compuestos llegan al agua mediante el denominado “ciclo urbano del agua”. A lo largo de este ciclo, el agua natural se somete a una serie de tratamientos con el objetivo de conseguir una calidad adecuada y obtener unos requisitos mínimos para poder ser utilizada por la población, procedimiento que se lleva a cabo en las Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP). Después de la distribución y consumo de agua potable tanto a nivel doméstico como industrial, ésta es tratada en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) donde su contaminación es reducida para alcanzar una mínima calidad antes de su vertido al medio natural [2]. Dentro de los contaminantes emergentes, en esta memoria nos hemos centrado en los antibióticos.

Cabe destacar que uno de los principales problemas de los antibióticos radica en que no son completamente eliminados en las plantas de tratamiento de agua, por lo que éstos se pueden encontrar en aguas superficiales, subterráneas y de consumo humano. Por ello, actualmente se está estudiando la eficiencia de otros tratamientos para minimizar la presencia de los mismos, que se clasifican en tres categorías: físicoquímicos (ultrafiltración, oxidación o adsorbentes), biológicos (membranas o tratamientos combinados) y avanzados (nanofiltración con membranas) [2, 3].

Debido a que su eliminación no es total, está aumentando la utilización de sensores para la detección y cuantificación de estos antibióticos en el medioambiente y en EDARs.

Un sensor es un dispositivo que recibe y responde a una señal o estímulo; teniendo entre sus características principales un bajo coste y alta eficiencia. Los sensores están formados por dos componentes: un receptor, que se encarga de reconocer el analito, y un transductor, cuya función es convertir la señal y transportarla hasta un dispositivo de medida [4, 5]. En ocasiones, para aumentar la selectividad del sensor se pueden utilizar elementos bioquímicos o biológicos (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos) como elementos sensores; obteniendo así los llamados biosensores [4]. En nuestro caso no se han utilizado biosensores, sino que se han desarrollado sensores electroquímicos (electrodos serigrafados o electrodos modificados mediante distintas dispersiones) que trabajan con técnicas voltamétricas.

Este trabajo está basado en la detección y cuantificación de un antibiótico, la D-Penicilamina; un compuesto farmacéutico utilizado frecuentemente con fines médicos frente a distintas enfermedades como la artritis, la cistinuria, enfermedades del hígado o la piel y la enfermedad de Wilson [6] . La D-PA es un compuesto biológicamente activo, por lo que tiene efectos adversos a muy bajas concentraciones (en valores de ppb ya es muy peligrosa) en el medioambiente (ya que se acumula con facilidad) y en la salud humana, debido a la ingesta de alimentos o agua contaminada.

Algunos de los métodos utilizados para la detección de la misma incluyen HPLC (cromatografía líquida de altas prestaciones), fluorimetría, calorimetría, espectrofotometría, quimiluminiscencia, electroforesis capilar y métodos electroquímicos [7], que son los que se han utilizado durante el proceso experimental de este trabajo. Con métodos como la fluorescencia o HPLC se obtienen límites de detección muy bajos, alrededor de 4ppbs; además de obtener reproducibilidades buenas por debajo del 5%. Sin embargo, los métodos electroquímicos tienen la ventaja frente a los demás métodos en que son rápidos, sencillos y baratos, además de tener una gran portabilidad y buena sensibilidad.

Dentro de los métodos electroquímicos, en este trabajo se diseñan distintos experimentos voltamperométricos como la voltametría de pulso diferencial (DPV) y voltametría cíclica (CV) para la detección del antibiótico [6]. Para la realización de estas técnicas, se han utilizado principalmente electrodos: electrodo de carbón vítreo (GC) [6, 8] y un electrodo de diamante con dopado de boro (BDD) [6, 9]. Estos electrodos funcionan correctamente para nuestro propósito ya que tienen una buena sensibilidad y reproducibilidad y permiten detectar la D-PA de forma rápida.

Una vez detectada la D-Penicilamina, se puede modificar el electrodo para obtener mejoras en alguna de las propiedades analíticas como el límite de detección, y eso ha sido lo que se ha hecho con el electrodo de GC; debido a que con las modificaciones de los electrodos se aumenta la VTC y la electrocatálisis. Para ello, se han utilizado dispersiones de distinto tipo como nanotubos de carbono multicapa [7, 10], nanopartículas de oro [11, 12] y grafeno [13,14, 15] . Por último, se utilizaron también dos electrodos metálicos como el de oro y el de platino para ver la eficiencia de los mismos en el propósito de nuestro trabajo.

También se puede detectar la D-PA con otras técnicas instrumentales como puede ser con un electrodo de gota de mercurio (HMDE) [16], mediante otras modificaciones con complejos de cobalto [17] o utilizando catecol como indicador de la D-PA [18].

Debido a que la D-Penicilamina origina una corriente a potenciales aproximados entre 0,5-1 V como resultado de la oxidación del grupo tiol de la molécula (ver Figura 1), es importante conocer la ventana de potencial de ambos electrodos para que no se oxiden los mismos antes de que se produzca la oxidación del antibiótico; porque si fuera así no podríamos realizar la detección y cuantificación del mismo. Para ello, se ha realizado un test para ver la ventana de potencial [19, 20] y se han hecho tratamientos con H₂SO₄ en algunos de esos tests con el objetivo de aumentar la ventana. También es importante conocer la capacidad redox de los electrodos de trabajo, para lo que se han realizado test de ferro/ferricianuro [20]. Es necesario tener en cuenta que en función de la cantidad de dopado en el BDD, la ventana de potencial y la capacidad redox varían, debido a la entrada de impurezas sp² en el proceso de dopado [21, 22].

2. Experimental

2.1 Reactivos y disoluciones

El antibiótico utilizado fue la D-Penicilamina (*Sigma-Aldrich, Co; St Louis; USA; Pureza: 98-101%; Rf: 102007598*). Tanto el envase con el antibiótico como las disoluciones realizadas del mismo se deben guardar en la nevera (4°C) para favorecer su conservación y evitar que pierdan sus propiedades.

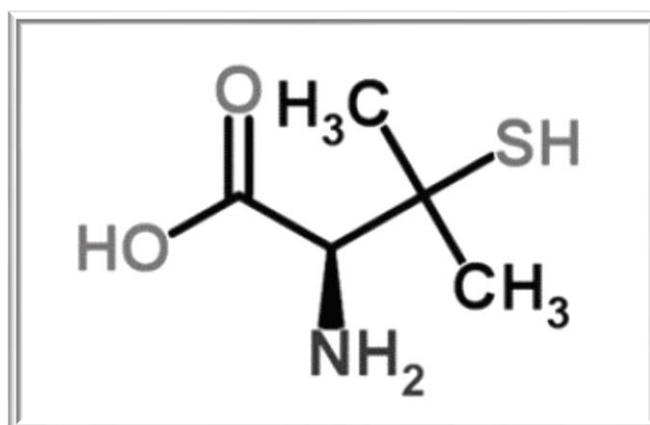


Figura 1. Estructura química de la D-Penicilamina. Imagen cogida del artículo que se especifica en las referencias bibliográficas [23].

El electrolito de soporte utilizado en el que se disolvió la D-Penicilamina fue un tampón fosfato (PBS) el cual se preparó disolviendo KH_2PO_4 (*Fisher Scientific U.K. Limited; Bishop Meadow Road; UK*) en agua obteniendo una concentración de 0.1 M y ajustando el pH con una disolución de NaOH (*Sigma Aldrich, Inc; St Louis; USA*) 2 M hasta llegar a pH 7,0.

Tanto las dispersiones de MWCNTs (*Aldrich Chemistry*) como la de AuNPs (*NanoXact*) se diluyeron para observar si se producía algún cambio con la concentración. También se hizo una disolución nueva de MWCNTs de 1 mg mL^{-1} . La dispersión de grafeno óxido (*Methrom DropSens S.L.; Asturias; España*) se preparó con una concentración de 1 mg mL^{-1} . Todas las dispersiones eran llevadas al ultrasonidos para favorecer su homogeneización durante un tiempo entre 15-20 minutos. Al igual que las disoluciones de D-Penicilamina, todas estas dispersiones también se deben guardar en la nevera para evitar que sus propiedades químicas se deterioren.

2.2 Instrumentación

Potenciostato AUTOLAB PGSTAT12 (Serial no: AUT71572; *Ecochemi, Netherlands*)



Figura 2. Lugar de trabajo: Potenciostato AUTOLAB PGSTAT12 controlado por ordenador, cubeta voltamétrica y electrodos de trabajo.

Permite medir en diferentes técnicas voltamétricas: voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial, cronoamperometría o impedancia electroquímica. La sensibilidad de medida de corriente es de $\pm 0,2\%$ con una resolución en la aplicación de potencial de ± 2 mV.

Se utilizó una cubeta en la que se introducían tres electrodos. Los electrodos de trabajo fueron el GC, BDD, y los electrodos metálicos de oro y de platino. Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino, cuya función es servir de vehículo para el intercambio de electrones; y como electrodo de referencia un electrodo de Ag|AgCl, el cual aporta un valor de potencial constante para poder de esta forma medir una diferencia de potencial (ΔE) [24].

Balanzas analíticas de precisión *Mettler* (precisión: $\pm 0,1$ mg), pH-metro, vortex, baño de ultrasonidos, micropipetas, material de vidrio aforado, tubos eppendorf y material de laboratorio básico.



Figura 3. Pequeña instrumentación utilizada en el procedimiento experimental. Izquierda: pH-metro. Derecha: Balanzas analíticas.

2.3 Procedimientos experimentales

2.3.1 Preparación de los electrodos

Es necesaria una limpieza del material de trabajo y de los electrodos. El electrodo de trabajo GC primero se lava con agua miliQ y posteriormente se pule con polvo de alúmina ($0,05 \mu\text{m}$ de diámetro) sobre un fieltro durante un tiempo aproximado de dos minutos para eliminar los posibles restos de antibióticos u otras interferencias que se pueden haber quedado adsorbidas al electrodo. Los electrodos de platino y oro se pulen con polvo de diamante ($3 \mu\text{m}$ de diámetro) sobre nylon. Los electrodos de GC una vez modificados no se pulen ya que se eliminaría la modificación realizada en la superficie

del electrodo, por lo que la limpieza es únicamente electroquímica. En el caso del BDD se realiza una limpieza únicamente con agua miliQ y posteriormente se seca al aire. Los electrodos de oro y de platino se lavan y se pulen con diamante antes de ser utilizado. Tanto el electrodo auxiliar como el de referencia se lavan con agua miliQ.

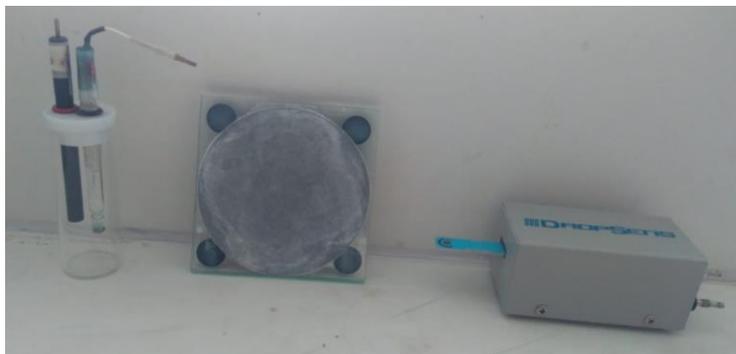


Figura 4. De derecha a izquierda: electrodo BDD serigrafiado (*DropSens*), Filtro para pulido del GC y cubeta con los electrodos de trabajo (GC, BAS MF-2012), auxiliar (Pt, BAS MW-1032) y de referencia (Ag|AgCl, BAS MF-2078).

2.3.2 Caracterización de los electrodos

Debido a que se va a detectar la D-PA mediante oxidación de la misma a potenciales mayores de cero, es importante conocer hasta qué potencial es capaz de llegar cada electrodo antes de oxidarse, para ver si puede ser utilizado o no. Para ello, se realizaron dos ensayos: uno para ver la ventana de potencial y el otro para comprobar la capacidad redox del electrodo y la superficie electrocatalítica.

El ensayo de ventana de potencial se realizó con H_2SO_4 (0,5 M) para ambos electrodos. El ensayo consistía en realizar barridos entre potenciales extremos, conociendo así los límites a los que podían llegar los electrodos. Para estos barridos la técnica utilizada fue la voltametría cíclica, pudiendo hacerse a distintas velocidades, siendo 50 y 100 mV s^{-1} las más utilizadas en este trabajo. También se puede variar el número de ciclos que se quieren obtener, aunque para conocer la ventana de potencial con un ciclo es suficiente. En algún caso se realizaron pruebas con pretratamientos catódicos o anódicos [25] con una disolución de H_2SO_4 (0,5M) para observar si conseguíamos aumentar la ventana de potencial en la que puede ser utilizado el electrodo.

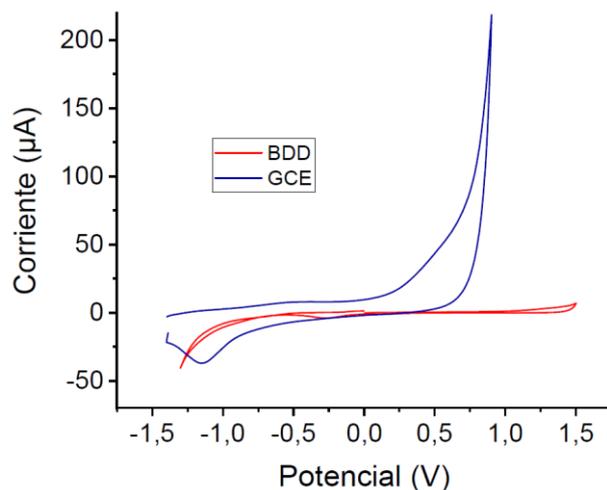


Figura 5. Test de ventana de potencial mediante voltametría cíclica en una disolución de H_2SO_4 (0,5 M) para los electrodos de diamante dopado con boro (BDD) y carbón vítreo (GC). Velocidad de barrido: 50mV s^{-1} . $N = 1$ ciclo.

El otro test fue el de ferrocianuro, en el que se midió una disolución de ferrocianuro potásico (0,5 mM) en H_2SO_4 (0,5 M) a distintas velocidades de barridos de potenciales (v) entre 20 y 100 mV s^{-1} utilizando la técnica de voltametría cíclica y se veía como influye la velocidad en la separación de los picos que aparecen, determinando de esta manera la capacidad redox del electrodo sobre el que se realiza el test.

2.3.3 Modificaciones del electrodo de carbón vítreo

Nanotubos de carbono multicapa

La dispersión de MWCNTs preparada en un tubo eppendorf se lleva al ultrasonidos durante 15-20 minutos. Las modificaciones del electrodo de trabajo se llevaron a cabo depositando un pequeño volumen del agente modificante ($5\ \mu\text{L}$) sobre su superficie y posterior secado con una corriente de N_2 . El volumen de la gota a añadir puede variar en función del diámetro de la superficie del electrodo que se quiere modificar, pero en nuestro caso el volumen ideal fue de $5\ \mu\text{L}$. Es importante que el volumen de agente modificante añadido no rebase por fuera del disco del electrodo, por lo que no es recomendable añadir un volumen mayor.

Se estudió también el efecto de la concentración de MWCNTs. Para ello se tomó 0,1 mL de la disolución y se llevó a otro eppendorf al que se añadieron 0,45 mL de H_2O y 0,45 mL de DMF para conseguir una dilución 1:10(v/v). Posteriormente se preparó otra

dilución del segundo eppendorf tomando los mismos volúmenes para conseguir otra dilución 1:10 (v/v). También se preparó otra dispersión de una concentración de 1 mg mL^{-1} de MWCNTs en una mezcla de H_2O y DMF (50% v/v).

Nanopartículas de oro

Se tomaron 20 μL de una dispersión de AuNPs de concentración 0,05 mg mL^{-1} y se llevaron a un eppendorf al que se añadieron también 20 μL de PBS, obteniendo así una concentración de 0,025 mg mL^{-1} . El tubo eppendorf se llevó al ultrasonidos durante 15-20 minutos aproximadamente. Posteriormente se tomaron 5 μL del agente modificante y se colocan sobre la superficie del electrodo. Se secó la gota con corriente de N_2 y se procedió a cuantificar la D-Penicilamina.



Figura 6. De derecha a izquierda: óxido de grafeno (GO), dispersión de nanopartícula de oro (AuNPs) y nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs).

Grafeno

Se tomó 1 mg de GO y se llevó a un tubo eppendorf al que se añadió H₂O y DMF (50% v/v) hasta llegar a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Después se realiza el mismo procedimiento del resto de las dispersiones.

En alguna ocasión se aplicó un potencial de -0.8 V durante 10 ó 15 minutos para obtener la forma reducida del grafeno óxido (rGO).

2.3.4 Cuantificación de D-Penicilamina con electrodos modificados y sin modificar

En las ocasiones en las que se utiliza el GC se coloca éste junto a los electrodos auxiliar y de referencia en una cubeta en la que se añade la D-PA disuelta en el electrolito (PBS). Con los electrodos de oro y platino se trabaja de la misma forma que con el GC a la hora de realizar la cuantificación de la D-PA.

En el caso del BDD se puede realizar la medición añadiendo una gota en la superficie del electrodo o sumergiéndolo en una disolución como en el caso del GC.



Figura 7. Electrodo serigrafiado de diamante dopado con boro en la cubeta voltamétrica.

Se realizaron medidas de disoluciones de D-PA de distintas concentraciones (entre 10 μ M y 30 mM en función del electrodo utilizado). Entre cada medida se procedió a hacer la limpieza y preparación de los electrodos y del material de trabajo (apartado 2.3.1).

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de electrodo de diamante dopado con boro y detección y cuantificación de D-Penicilamina

En el test de ventana de potencial, hemos obtenido una ventana de potencial entre -1,3 y +1,5 V (ventana de potencial = 2,8 V), siendo ésta mayor que para el GC (Figura 3). Sin embargo, este electrodo se caracteriza por tener una ventana de potencial muy amplia (>3 V) y poder ser utilizado para analizar sustancias electroactivas[20]. Se han realizado experiencias para aumentar dicha ventana aplicando un potencial negativo o positivo (-3 ó +3 V) durante un tiempo determinado (desde 3 a 30 minutos) con una disolución de H₂SO₄ (0,5 M) [25]. Este pretratamiento permite eliminar las impurezas sp² del electrodo debidas al dopado con especies de C_{sp}². Tras estos tratamientos catódicos y anódicos no se observó ningún cambio, por lo que se decidió que no era necesario.

El test FC nos permite saber si el intercambio de electrones se da de forma reversible o irreversible y si predomina el fenómeno de adsorción o el de difusión. Para ello, hay que fijarse inicialmente en la separación de los picos catódico y anódico. Debido a que la separación entre los picos (véase Tabla 1) $\Delta E_p > 50/n$ (siendo n = 1, ya que es el número de electrones intercambiados en la reacción redox) en todas las velocidades, el intercambio de electrones se da de forma irreversible en todos los casos, lo cual nos indica que la velocidad de transferencia de masa > velocidad de transferencia de carga. Los picos obtenidos en el test no son simétricos (al aumentar la velocidad se hacen cada vez más asimétricos), por lo que el fenómeno que predomina es el de difusión. Además, se representó la intensidad de los picos catódico y anódico frente a la velocidad de barrido y frente a la raíz de la misma. La VTC aumenta a medida que disminuye ΔE_p , por lo que a menores velocidades la VTC es mayor (véase Tabla 1).

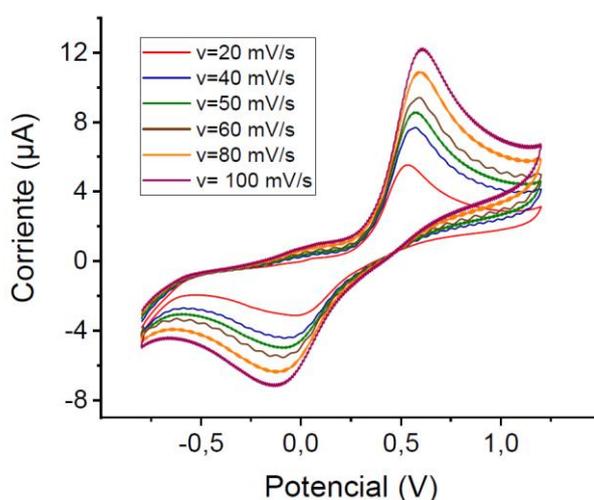


Figura 8. Test de ferrocianuro mediante voltametría cíclica de una disolución de ferrocianuro potásico (0,5 mM) en H₂SO₄ (0,5 M) en un electrodo BDD a distintas velocidades. N = 1 ciclo.

El resultado obtenido ha sido que el coeficiente de regresión lineal (R) de la recta $I = k \cdot v^{1/2}$ es ligeramente mayor que en la recta $I = k \cdot v$ en el pico catódico, lo que nos muestra que el fenómeno de difusión es ligeramente predominante sobre el de adsorción. Este resultado nos indica que el ferrocianuro se encuentra disuelto en la disolución y no adsorbido a la superficie del electrodo BDD.

Los resultados de este test son diferentes en cada electrodo, ya que las reacciones redox dependen de las características de la superficie de los electrodos.

v (m s ⁻¹)	$v^{1/2}$ (mV s ⁻¹)	E_{pa} (V)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (V)	I_{pc} (μA)	ΔE_p (V)
20	4,47	0,52	4,21	-0,002	-2,11	0,522
40	6,32	0,57	5,74	-0,036	-3,57	0,606
50	7,07	0,57	6,19	-0,075	-2,73	0,645
60	7,75	0,59	6,83	-0,085	-3,67	0,675
80	8,94	0,58	8,12	-0,080	-5,06	0,66
100	10	0,61	6,77	-0,097	-5,73	0,707

Tabla 1. Resultados obtenidos en el test de ferrocianuro utilizando la técnica de voltametría cíclica con el electrodo BDD a distintas velocidades. N = 1 ciclo.

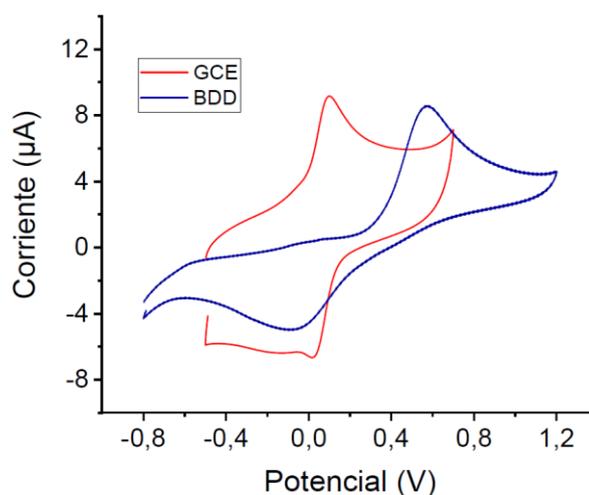


Figura 9. Test de ferrocianuro en un electrodo de carbón vítreo y de diamante dopado con boro. Velocidad de barrido = 50mV s⁻¹. N = 1 ciclo.

Una ventaja que tiene el BDD frente al GC es que tiene una menor corriente de fondo, como se puede ver en la comparación (Figura 11).

La cuantificación de D-PA se realizó con disoluciones de distintas concentraciones para observar el aumento de corriente en la señal con la concentración. Se hizo una curva de calibrado para comprobar que había una relación lineal entre ambas.

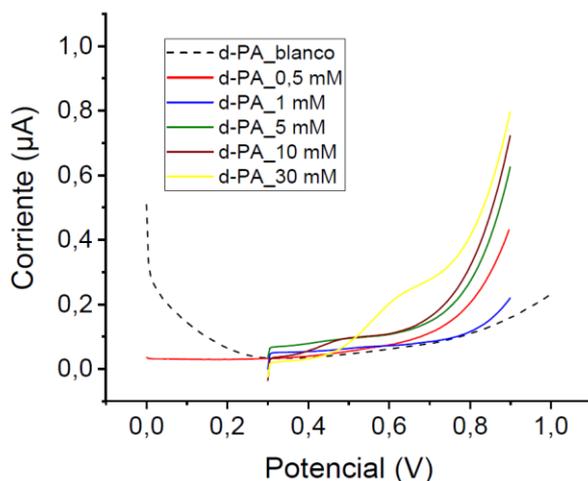


Figura 10. D-Penicilamina disuelta en tampón fosfato (0.1 M, pH = 7) con el electrodo serigrafiado de diamante dopado con boro a las concentraciones indicadas. La medida se realizó con la técnica de voltametría de pulso diferencial.

Como se ve en la Figura 12, se obtiene un pico debido a la oxidación del grupo tiol (SH, ver Figura 1) de la D-Penicilamina. En el mecanismo de oxidación de la D-Penicilamina (Figura 11) se forma un puente disulfuro que tiene tendencia a adsorberse en la superficie del electrodo. Esta señal aumenta de tamaño al aumentar la concentración, lo cual nos confirma que se debe al antibiótico. El pico aparece a potenciales aproximados de +0,5 V; pudiendo desplazarse en algunos casos como es el de la disolución más concentrada (en la concentración 30 mM aparece a 0,62 V). El rango de concentraciones en el que se ha estudiado la detección y cuantificación de la D-PA para este electrodo fue 0,5-30 mM.

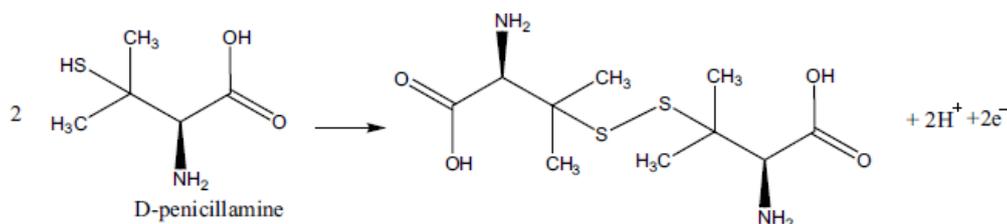


Figura 11. Formación de un puente disulfuro en la oxidación de la D-Penicilamina. Imagen sacada de la referencia [26].

Por debajo de un concentración de 0,5 mM no se ha podido detectar la presencia de antibiótico (véase en la Figura 12 que en la concentración de 0,5 mM la señal ya es muy pequeña, apenas de 0,543 nA).

<i>[D-PA]</i> (mM)	<i>Altura 1</i> (nA)	<i>Altura 2</i> (nA)	<i>Media</i> (nA)	<i>Área 1</i> (nC)	<i>Área 2</i> (nC)	<i>Media</i> (nC)
0,5	0,543	0,682	0,612	0,011	0,014	0,012
1	1,949	1,832	1,891	0,135	0,135	0,135
5	2,622	2,322	2,472	0,233	0,215	0,224
10	15,214	18,861	17,037	1,686	2,024	1,855
30	24,951	26,924	25,937	2,763	3,043	2,903

Tabla 2. Curva de calibrado de la D-Penicilamina en el electrodo serigrafiado de diamante dopado con boro utilizando la técnica DPV.

En la curva de calibrado se representa la concentración creciente de D-Penicilamina frente a la altura o al área de las señales obtenidas. Se realizan dos medidas de cada concentración y se obtiene el valor medio. En ambos casos la relación entre ambas variables es lineal, con un coeficiente de lineal aceptable ($y = 0,8709x + 1,4909$ con $R = 0,9367$ en el caso de la altura, $y = 0,0997x + 0,0987$ con $R = 0,9403$ para el área).

3.2 Caracterización de electrodo de carbón vítreo y detección y cuantificación de D-Penicilamina

Con este electrodo se ha obtenido una ventana de potencial de 2,4 V aproximadamente (desde -1,4 hasta +1 V), como se puede observar en la Figura 5. Como ya he comentado en el apartado 3.1, este electrodo tiene una ventana de potencial menos que el BDD; sobre todo en el sentido de la oxidación puesto que este electrodo se oxida a potenciales menores. Debido a esto, el GC es menos recomendable para medir especies electroactivas como es la D-Penicilamina en nuestro caso. Sin embargo, debido a que la oxidación del grupo tiol del antibiótico nos proporciona una señal a potenciales menores de 1 V, este electrodo también nos permite realizar la detección y cuantificación de la D-PA. En este caso no hemos realizado pretratamientos catódicos ni anódicos ya que no sabíamos si le iba a afectar negativamente al electrodo GC.

En el test de ferrocianuro, como ya se ha visto antes, se ha obtenido una mayor corriente de fondo que en el caso del BDD (ver Figura 10). En este electrodo, la separación entre

los picos (ΔE) no aumenta al aumentar la velocidad de barrido (Tabla 3). Además, ΔE es bastante menos que en el BDD. Sin embargo, la reacción es igualmente irreversible ya que $\Delta E < 50/n$ (igual que en el BDD), por lo que velocidad de transferencia de masa $>$ velocidad de transferencia de carga. Al representar la velocidad frente a la intensidad se obtiene un coeficiente de regresión lineal ligeramente mejor en el caso de la recta con los valores de $v^{1/2}$. Esto, unido a que los picos anódico y catódico no son simétricos, nos indica que predomina en este caso también el efecto de la difusión sobre el de adsorción. Por lo tanto, aunque la separación de las señales de oxidación y reducción es apreciablemente menor que para el BDD debido a que este test depende de sustrato, las conclusiones sacadas son las mismas. La VTC es igual a todas las velocidades en este caso ya que ΔE_p permanece constante.

v (mV s^{-1})	$v^{1/2}$ (mV s^{-1})	E_{pa} (V)	I_{pa} (μA)	E_{pc} (V)	I_{pc} (μA)	ΔE_p (V)
20	4,47	0,099	2,984	0,025	-2,668	0,074
40	6,32	0,098	4,261	0,025	-3,499	0,073
50	7,07	0,098	4,704	0,025	-4,288	0,073
60	7,74	0,098	5,001	0,025	-4,433	0,073
80	8,94	0,100	6,007	0,026	-4,558	0,075
100	10	0,103	6,972	0,025	-5,073	0,077

Tabla 3. Test ferrocianuro en el electrodo de carbón vítreo a distintas velocidades. N = 1 ciclo.

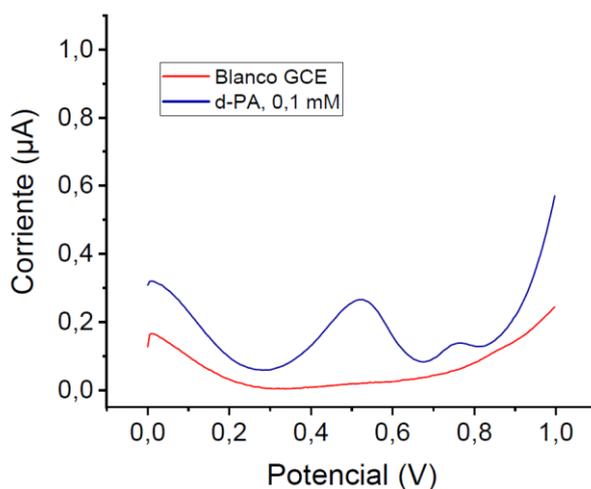


Figura 12. Disolución de tampón fosfato (en ausencia de antibiótico) en un electrodo de carbón vítreo utilizando la técnica de voltametría de pulso diferencial y disolución 0,1mM de D-Penicilamina. Velocidad de barrido = $0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Con este electrodo también se ha realizado una calibración para comprobar que se daba una relación lineal entre la concentración de D-Penicilamina y las señales obtenidas en la oxidación del antibiótico.

<i>[D-Pen]</i> (mM)	<i>Altura 1</i> (μ A)	<i>Altura 2</i> (μ A)	<i>Media</i> (μ A)	<i>Área 1</i> (μ C)	<i>Área 2</i> (μ C)	<i>Media</i> (μ C)
0,01	0,024	0,041	0,032	$4,03 \cdot 10^{-3}$	$9,52 \cdot 10^{-3}$	$5,63 \cdot 10^{-3}$
0,025	0,080	0,076	0,069	0,015	0,011	0,013
0,05	0,167	0,185	0,168	0,032	0,038	0,035
0,1	0,192	0,236	0,295	0,033	0,043	0,038
0,15	0,491	0,453	0,464	0,098	0,089	0,093
0,2	0,699	0,653	0,668	0,140	0,116	0,127
0,25	0,710	0,740	0,716	0,125	0,156	0,139
0,5	1,695	1,692	1,693	0,307	0,310	0,308
0,75	1,934	2,023	1,979	0,330	0,382	0,355

Tabla 4. Recta de calibrado de la D-Penicilamina en el electrodo de carbón vítreo.

Para este se han obtenido mejores resultados en cuanto al límite de detección y se han podido analizar las señales para concentraciones menores (siendo la menor concentración medida 10μ M). Es muy importante pulir bien la superficie del electrodo GC durante el tiempo aproximado de dos minutos sobre el polvo de alúmina (además de limpiar los electrodos auxiliar y de referencia) ya que al estar analizando concentraciones muy pequeñas de antibiótico, cualquier interferencia puede provocar errores en la medida. El límite de detección para este electrodo se ha calculado en una concentración de $4,11\ \mu$ M ($0,613\ \text{ppm}$) y el límite de cuantificación en $13,6\ \mu$ M ($2,029\ \text{ppm}$). Ambos límites se han calculado con la desviación estándar del blanco. El rango lineal de concentraciones obtenido con el electrodo GC fue de $0,014$ - $0,75\ \text{mM}$.

Las ecuaciones de las curvas de calibrado han sido $y = 2,8204x + 0,0256$ en el caso de la altura y en el caso del área $y = 0,5076x + 0,0086$. Se han obtenido buenos coeficientes de regresión lineal tanto para la altura de las señales ($R = 0,9862$) como para las áreas de los picos ($R = 0,9838$).

Otra propiedad analítica que se analizó con este electrodo fue su reproducibilidad mediante la realización de 5 medidas de una disolución de una misma concentración determinada (en este caso se ha utilizado una disolución de $[D-PA] = 0,1\ \text{mM}$). Se obtuvo una reproducibilidad aceptable: $0,2308 \pm 0,022$ (media \pm SD), obteniendo un valor de desviación estándar relativa por debajo del 10% ($\%RSD = 9,5\%$).

3.3 Cuantificación de la D-Penicilamina con el electrodo de carbón vítreo modificado

La primera modificación que se hizo del GC fue con nanotubos de carbono multicapa. Se hicieron pruebas con distintas concentraciones (1 mg mL^{-1} y diluciones). Después del procedimiento de preparación descrito en el apartado 2.3.3, se procede a la cuantificación del antibiótico. Como se puede ver en la Figura 13, se obtiene un pico de oxidación a un potencial de 0,8 V. Este pico tiene una corriente menor que en caso del *GC bare*, por lo que el efecto electrocatalítico no fue satisfactorio.

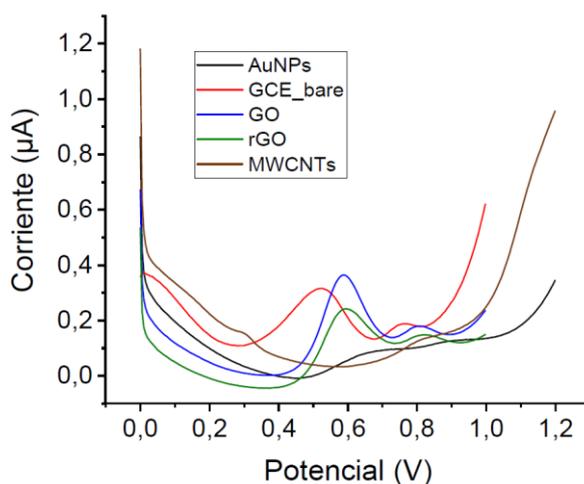


Figura 13. Disolución 0,01mM D-Penicilamina en GC y modificaciones.

En el caso de la modificación del GC con nanopartículas de oro, se obtiene una señal anódica a un potencial aproximado de 0,65 V. Esta señal también es pequeña comparada con el *GC bare*, obteniendo una corriente menor.

El grafeno fue el compuesto que mejor nos funcionó para las modificaciones, obteniendo resultados similares a los del *GC bare* (aparecen los dos picos que se ven también en el *GC bare* a potenciales similares y de la misma altura). Se hicieron experimentos con la forma oxidada y la forma reducida del grafeno, aunque no se apreciaron diferencias entre ambas (Figura 13).

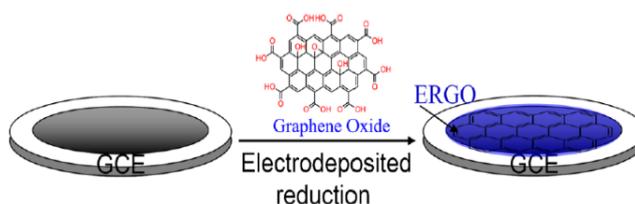


Figura 14. Deposición y reducción del grafeno óxido en un electrodo de carbón vítreo. Imagen cogida del artículo que se especifica en las referencias bibliográficas [14].

En cuanto a las modificaciones del GC, se realizó una prueba más, que consistía en un *nanocomposite* de AuNPs y GO, añadiendo un volumen de 5 μL de cada uno de ellos a la superficie del electrodo. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos cuando se modificaba sólo con AuNPs, es decir, menor corriente que con el GC *bare*.

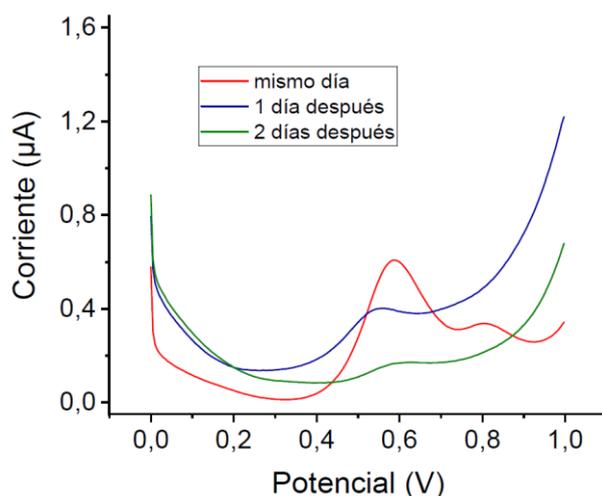


Figura 15. Disolución D-penicilamina (0,5mM) en electrodo GC modificado con grafeno en su forma reducida. Estudio de la durabilidad. De izquierda a derecha: día de la modificación, día siguiente, dos días después.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en las modificaciones es el tiempo de vida de las mismas, es decir, cuánto tiempo dura la modificación y cuántas medidas se pueden hacer con la misma. El efecto de la modificación va disminuyendo con el tiempo y con las medidas realizadas, hasta que se llega a un punto en el que se desvanece por completo y es necesario volver a modificar la superficie del electrodo.

También se ha estudiado la reproducibilidad de las modificaciones realizadas. En todas las modificaciones se ha obtenido una reproducibilidad adecuada con unos valores de %RSD entre 7-10%.

3.4 Cuantificación de la D-Penicilamina con los electrodos metálicos de oro y platino

Los últimos electrodos que se estudiaron en este trabajo fueron el de oro y el de platino. Estos electrodos no se pulen en polvo de alúmina, sino que se pulen con polvo de diamante.

La principal diferencia de estos electrodos con el GC es la diferencia del diámetro, que en el caso de esos electrodos metálicos. El diámetro del GC es 3 mm mientras que el de los electrodos de oro y platino es de 1,5 mm. Debido a esto, las señales de oxidación de la D-Penicilamina son mucho más pequeñas y no son comparables a las del GC.

Para comprobar si estos electrodos metálicos son buenos para la detección y cuantificación del antibiótico, lo que se calcula es la densidad de corriente (j), es decir, la intensidad de la señal en relación a la superficie del electrodo. Sin embargo, al medir esta propiedad, se obtuvo un valor de densidad de corriente mucho menor que para el GC ($j_{Pt} = 3,61 \mu A \cdot cm^{-2}$, $j_{Au} = 5,66 \mu A \cdot cm^{-2}$, $j_{GC} = 24 \mu A \cdot cm^{-2}$).

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de estos electrodos y conseguir señales de intensidades mayores, se modificaron estos electrodos con grafeno en forma oxidada y reducida. Al realizar estas modificaciones, las señales obtenidas no diferían de las obtenidas sin modificación.

4. Conclusiones

1. Este trabajo desarrollan nuevos procedimientos voltamétricos sensibles para la detección y cuantificación de un contaminante emergente como es el antibiótico D-PA. Los procedimientos voltamétricos descritos dan lugar a sensores rápidos para la determinación de D-PA.
2. Se ha comparado la eficiencia electroquímica en la oxidación de la D-PA utilizando distintos sustratos de electrodos (BDD, GC *bare*, GC modificado con grafeno, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, y electrodos sólidos de oro y platino), utilizando un barrido de pulso diferencial y voltametría cíclica. Las mayores corrientes se obtuvieron con electrodos de carbón vítreo (GC) sin modificar, y electrodos GC modificado con grafeno (GO, rGO), debido probablemente a su carácter hidrófobo y afinidad por el antibiótico, además de su efecto electrocatalítico.
3. Las ventanas de potencial útiles para la oxidación del antibiótico han sido:
 - De -1,3 V hasta +1,5 V para el BDD (ventana de potencial de 2,8 V)
 - De -1,4 V hasta +1 V para el GC (ventana de potencial de 2,4 V)

El BDD muestra una oxidación a un potencial más catódico, lo que hace que la oxidación de la D-PA pudiera llevarse a cabo mediante distinto mecanismo a potenciales mayores que con el sustrato GC.

En el test de ferrocianuro se ha obtenido una buena capacidad redox de ambos electrodos, siendo los picos de oxidación irreversibles y predominando el mecanismo de difusión sobre el de adsorción. La separación entre las señales catódicas y anódicas es mayor en el caso del BDD (0,6 V aproximadamente) que

en el caso del GC (0,074 V). Debido al resultado positivo de los dos ensayos, los electrodos fueron adecuados para la determinación y cuantificación de la D-Penicilamina.

4. La ventana de potencial de los electrodos anteriores no cambia después de los pretratamientos catódicos (aplicar +3 V durante 3 ó 30 minutos) ni anódicos (aplicar -3 V durante 3 ó 30 minutos) con H₂SO₄, por lo que no se ha aumentado la actividad electrocatalítica con esta forma de regeneración y limpieza electroquímica.
5. Para una concentración de 0,1 mM de D-PA las señales obtenidas para los distintos electrodos fueron: 0,1922 μA (GC bare), 13,212 nA (MWCNTs modified GC), 36 nA (AuNPs modified GC), 0,1911 μA (GO/rGO modified GC). En el caso del BDD para una concentración de 0,1 mM de D-PA no se obtiene señal, teniendo éste el LD en 0,5 mM (con una señal de 0,5 nA).
6. El electrodo GC bare tiene una mayor densidad de corriente (j) que los electrodos metálicos de oro y platino ($j_{Pt} = 3,61 \mu A \cdot cm^{-2}$, $j_{Au} = 5,66 \mu A \cdot cm^{-2}$, $j_{GC} = 24 \mu A \cdot cm^{-2}$). Debido a esto, el GC bare también ofrece mejores resultados ya que, para un electrodo de la misma superficie las corrientes son mayores y se puede cuantificar mejor el electrodo.
7. En la calibración se ha obtenido una dependencia lineal de la señal con la concentración de D-Penicilamina que se ha estudiado con los distintos electrodos (modificados), aunque con distinta sensibilidad debido a velocidades de transferencia de carga distintas y diferentes propiedades electrocatalíticas.
8. Las ecuaciones del calibrado obtenidas (rango lineal) han sido:
 - $y (\mu A) = 2,8204 x (mM) + 0,0256$ (R = 0,9862) para el GC (Rango lineal: 0,014 – 0,075 mM de D-PA)
 - $y (\mu A) = 0,8709 x (mM) + 1,4909$ (R = 0,9367) para el BDD. (Rango lineal: 0,5 – 30 mM de D-PA)

Estas ecuaciones nos indican que ambos tipos de electrodos son capaces de detectar y cuantificar de forma sensible la D-Penicilamina.

9. De las distintas modificaciones propuestas (AuNPs, GO, rGO, MWCNTs) la que mejor ha funcionado ha sido la del grafeno, obteniendo señales similares a las del GC *bare* (0,1942 μA para una concentración de D-PA de 0,1 mM). Una ventaja que tiene el grafeno (tanto su forma oxidada como reducida) sobre el GC es que la velocidad de transferencia de carga del D-PA es mayor, por lo que los picos voltamétricos son más estrechos y más simétricos, además de disminuir con el electrodo modificado la corriente de base con respecto a GC sin modificar.

10. Se ha estudiado el tiempo de vida de estas modificaciones comprobándose que, lógicamente, el efecto de las modificaciones disminuye con el tiempo y al aumentar el número de medidas. Los electrodos modificados típicamente pueden emplearse durante aproximadamente 15 medidas voltamétricas.
11. En el caso del GC *bare* se ha obtenido un límite de detección = 0,613 ppm y un límite de cuantificación = 2,029 ppm; consiguiendo un rango lineal de 0,014-0,75mM de D-PA.
12. La reproducibilidad tanto del GC *bare* como de las modificaciones del mismo es buena para las concentraciones medidas de forma rápida, obteniendo valores de %RSD < 10% en todos los casos, siendo el electrodo modificado con GO el de menor %RSD (%RSD_{GO} = 6,3%).
13. Comparando los resultados obtenidos con los distintos electrodos y las modificaciones, se observa que el electrodo con mejores propiedades analíticas para la detección y cuantificación de la D-Penicilamina son el GC *bare* y el GC modificado con GO/rGO.
14. Los procedimientos voltamétricos que se proponen permiten su uso en forma de sensores amperométricos o voltamétricos, para la cuantificación rápida y sencilla de D-PA. Si bien otras técnicas analíticas instrumentales pueden ser más sensibles para este antibiótico (por ejemplo HPLC con detección UV-Visible o EAM-UV-Vis), la instrumentación es más compleja y no es portable. Un potencióstato y sistema de electrodos puede fácilmente utilizarse *in situ*, por ejemplo en aquéllos lugares del medio ambiente contaminados con el antibiótico (aguas naturales fundamentalmente).

5. Referencias bibliográficas

- [1] M. Sanz, “Contaminantes Emergentes Y Cadena Alimentaria,” 2017.
- [2] J. E. Becerril Bravo, “Contaminantes emergentes en el agua,” *Rev. Digit. Univ.*, vol. 10, no. 8, pp. 1–7, 2009.
- [3] M. Janet Gil, A. María Soto, J. Iván Usma, and O. Darío Gutiérrez, “Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos,” vol. 7, no. 2, pp. 52–73, 2012.
- [4] A. Baeza, “Sensores y Biosensores Electroquímicos Dr. Alejandro Baeza,” *Fac. Quim. UNM*, pp. 1–15, 2005.
- [5] R. Kazemi-Darsanaki, A. Azizzadeh, M. Nourbakhsh, G. Raeisi, and M. AzizollahiAliabadi, “Biosensors: Functions and Applications,” *J. Biol. Today’s World*, vol. 2, no. 1, 2013.
- [6] N. Wangfuengkanagul and O. Chailapakul, “Electrochemical analysis of D-penicillamine using a borondoped diamond thin film electrode applied to flow injection system,” *Talanta*, vol. 58, no. 6, pp. 1213–1219, 2002.
- [7] F. Chekin, J. B. Raouf, S. Bagheri, and S. B. Abd Hamid, “Fabrication of chitosan-multiwall carbon nanotube nanocomposite containing ferri/ferrocyanide: Application for simultaneous detection of D-penicillamine and tryptophan,” *J. Chinese Chem. Soc.*, vol. 59, no. 11, pp. 1461–1467, 2012.
- [8] J. B. Raouf, R. Ojani, M. Majidian, and F. Chekin, “Voltammetric determination of D-penicillamine based on its homogeneous electrocatalytic oxidation with potassium iodide at the surface of glassy carbon electrode,” *Russ. J. Electrochem.*, vol. 46, no. 12, pp. 1395–1401, 2010.
- [9] M. Antonio, Q. Alfaro, S. Ferro, C. A. Martínez-huitle, and Y. M. Vong, “Boron Doped Diamond Electrode for the Wastewater Treatment,” vol. 17, no. 2, pp. 227–236, 2006.
- [10] U. Acid and D.- Penicillamine, “Novel Carbon Nanotube Paste Electrode for Simultaneous Determination of Novel Carbon Nanotube Paste Electrode for Simultaneous Determination of Norepinephrine , Uric Acid and D-Penicillamine,” no. April, 2010.
- [11] W. Liu, Q. Shi, G. Zheng, J. Zhou, and M. Chen, “Electrocatalytic oxidation toward dopamine and acetaminophen based on AuNPs@TCnA/GN modified glassy carbon electrode,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1075, pp. 81–90, 2019.
- [12] F. Y. Kong *et al.*, “A novel electrochemical sensor based on Au nanoparticles/8-aminoquinoline functionalized graphene oxide nanocomposite for paraquat detection,” *Nanotechnology*, vol. 30, no. 28, p. 285502, 2019.
- [13] Tajika, “CHEMISTRY A Sensitive Chlorpromazine Voltammetric Sensor Based on Graphene Oxide,” 2019.
- [14] X. Chen, D. Li, W. Ma, T. Yang, Y. Zhang, and D. Zhang, “Preparation of a glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide and overoxidized

- electropolymerized polypyrrole, and its application to the determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid,” *Microchim. Acta*, vol. 186, no. 7, pp. 2–11, 2019.
- [15] M. Chen, H. Lv, X. Li, Z. Tian, and X. Ma, “Determination of gallic acid in tea by a graphene modified glassy carbon electrode,” *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 4852–4860, 2019.
- [16] A. Ion, F. G. B??nic??., A. G. Fogg, and H. Kozlowski, “Cathodic stripping voltammetry of D-penicillamine and N-acetylcysteine in the presence of nickel ion,” *Electroanalysis*, vol. 8, no. 1, pp. 40–43, 2005.
- [17] S. Shahrokhian, A. Souiri, and H. Khajehsharifi, “Electrocatalytic oxidation of penicillamine at a carbon paste electrode modified with cobalt salophen,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 565, no. 1, pp. 95–101, 2004.
- [18] J. B. Raoof, R. Ojani, M. Amiri-Aref, and F. Chekin, “Catechol as an electrochemical indicator for voltammetric determination of D-penicillamine in aqueous media at the surface of carbon paste electrode,” *Russ. J. Electrochem.*, vol. 48, no. 4, pp. 450–456, 2012.
- [19] A. Barbosa Lima, L. F. Ferreira, S. L. Barbosa, E. de Souza Gil, R. Amorim Bezerra da Silva, and W. T. Pio dos Santos, “Selective Determination of Verapamil in Pharmaceuticals and Urine Using a Boron-doped Diamond Electrode Coupled to Flow Injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection,” *Electroanalysis*, vol. 30, no. 8, pp. 1872–1877, 2018.
- [20] N. Yang *et al.*, “Conductive diamond: Synthesis, properties, and electrochemical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 48, no. 1, pp. 157–204, 2019.
- [21] K. Muzyka, J. Sun, T. H. Fereja, Y. Lan, W. Zhang, and G. Xu, “Boron-doped diamond: Current progress and challenges in view of electroanalytical applications,” *Anal. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 397–414, 2019.
- [22] S. Garcia-Segura, E. Vieira Dos Santos, and C. A. Martínez-Huitle, “Role of sp³/sp² ratio on the electrocatalytic properties of boron-doped diamond electrodes: A mini review,” *Electrochem. commun.*, vol. 59, pp. 52–55, 2015.
- [23] M. A. Saracino *et al.*, “A novel HPLC-electrochemical detection approach for the determination of D-penicillamine in skin specimens,” *Talanta*, vol. 103, pp. 355–360, 2013.
- [24] Departamento de Química Analítica, “Introducción a los métodos electroanalíticos,” p. 5.
- [25] R. Kiran, E. Scorsone, J. de Sanoit, J.-C. Arnault, P. Mailley, and P. Bergonzo, “Boron Doped Diamond Electrodes for Direct Measurement in Biological Fluids: An In Situ Regeneration Approach,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 160, no. 1, pp. H67–H73, 2013.
- [26] M. Jafari, J. Tashkhourian, and G. Absalan, “Electrochemical sensing of D-penicillamine on modified glassy carbon electrode by using a nanocomposite of gold nanoparticles and reduced graphene oxide,” *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 14, no. 6, pp. 1253–1262, 2017.

Abreviaturas empleadas en esta memoria

D-PA: D-Penicilamina

BDD: Electrodo serigrafiado de diamante dopado con boro

GC: Electrodo de carbón vítreo

MWCNTs: Nanotubos de carbono multicapa

AuNPs: Nanopartículas de oro

GC *bare*: Electrodo de carbón vítreo sin modificar

DPV: Voltametría de pulso diferencial

EPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos

ETAP: Estaciones de tratamiento de agua potable

EDAR: Estaciones depuradoras de aguas residuales

CE: Contaminante emergente

HPLC: Cromatografía líquida de altas prestaciones

CV: Voltametría cíclica

HMDE: Electrodo de gota de mercurio

PBS: Disolución tampón fosfato

ΔE_p : Incremento de potencial de pulso

DMF: Dimetilformamida

FC: Ferrocianuro

RSD: Desviación estándar relativa

SD: Desviación estándar

GO/rGO: Grafeno óxido/Grafeno óxido en su forma reducida

J: Densidad de corriente

I_{pa} : Intensidad del pico anódico

I_{pc} : Intensidad del pico catódico

E_{pa} : Potencial del pico anódico

E_{pc} : Potencial del pico catódico

UV-Vis: Ultravioleta-visible

EAM-UV-Vis: Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible

